Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés : étude des voies de signalisation impliquées

Vanessa Delcroix

▶ **To cite this version:**

Vanessa Delcroix. Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés : étude des voies de signalisation impliquées. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0837 . tel-02399188

HAL Id: tel-02399188
https://theses.hal.science/tel-02399188

Submitted on 9 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie

Par Vanessa DELCROIX

Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés

Etude des voies de signalisation impliquées

Sous la direction de : Dr. Pierre VACHER

Soutenue publiquement le 8 Décembre 2017

Membres du jury :

M. SAVINEAU Jean-Pierre	PU à l'Université de Bordeaux	Président
Mme BIANCHINI Laurence	CR à l'Institut IRCAN à Nice	Rapporteure
M. REBOUL Pascal	PU à l'Université de Lorraine	Rapporteur
M. VAN COPPENOLLE Fabien	PU à l'Université Claude Bernard Lyon I	Examinateur
M. DUCRET Thomas	PU à l'Université de Bordeaux	Invité
M. VACHER Pierre	CR à l'Institut Bergonié à Bordeaux	Directeur de thèse

Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés : Etude des voies de signalisation impliquées

Résumé

La protéine Klotho (KL) possède des propriétés anti-vieillissement et anti-cancer. Les données cliniques montrent que l'expression de KL est associée à une meilleure survie des patients atteints de liposarcome. De plus, elle est réduite par rapport au tissu sain dans les liposarcomes dédifférenciés (DDLPS), un type de tumeur maligne rare mais de mauvais pronostic. Nos résultats montrent que KL sensibilise les DDLPS aux chimiothérapies (gemcitabine, navitoclax). L'abondance de KL dans les tumeurs pourrait donc servir de biomarqueur pour prédire l'efficacité des chimiothérapies et mettre en place une médecine plus personnalisée. De plus, des médicaments utilisés pour d'autres pathologies et connus pour stimuler l'expression de KL (Cozaar) pourraient être testés en association avec la chimiothérapie. Enfin, inspirés par le mode d'action de KL, nous avons testé la combinaison de la gemcitabine avec le navitoclax, qui s'est révélée très efficace sur les DDLPS.

Mots-clés: Klotho, liposarcome, calcium, stress réticulaire, IGF1R, chimiorésistance

---

Deciphering the signaling pathways involved in Klotho-mediated chemosensitization of dedifferentiated liposarcomas

Abstract

Klotho (KL) is both an anti-ageing and anti-cancer protein. Analysis of clinical data highlights that high expression of KL is associated with a better overall survival of liposarcoma patients. Moreover, its expression in downregulated in dedifferentiated liposarcomas (DDLPS), a rare type of tumor associated with a poor prognosis due to high chemoresistance. Our results show that KL sensitizes DDLPS cells to chemotherapeutic agents (gemcitabine, navitoclax). So, abundance of KL in tumoral tissues could serve as a biomarker for predicting gemcitabine efficacy and so, could help for establishing personalized therapy. Moreover, drugs increasing KL expression could be tested in combination with chemotherapy. Based on KL mechanism of action, we also highlight that the combination between gemcitabine and navitoclax is very effective for killing DDLPS cells.

Keywords: Klotho, liposarcoma, calcium, ER stress, IGF-1R, chemoresistance

---

Unité de recherche

INSERM U1218 ACTION – Institut Bergonié, 229 cours de l'Argonne, 33000 BORDEAUX

RÔLE DE KLOTHO DANS LA CHIMIOSENSIBILISATION DES LIPOSARCOMES DEDIFFERENCIES : ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES

Résumé scientifique du projet de thèse

Les liposarcomes (LPS) sont des tumeurs malignes rares et hétérogènes, dérivées de cellules ayant suivi une différenciation adipocytaire. Lors de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux liposarcomes dédifférenciés (DDLPS), qui sont des tumeurs caractérisées par un taux de rechute locale très élevé et un risque métastatique de 17 à 30% selon les études. Face au mauvais pronostic de ces tumeurs, il est nécessaire de développer des thérapies ciblées et d'identifier des facteurs prédictifs de la réponse au traitement.

Le gène *kl*, codant pour la protéine Klotho (KL), a été découvert grâce à des modèles murins de vieillissement accéléré qui étaient mutés pour ce gène. KL existe sous deux formes, membranaire et soluble, et favorise la longévité notamment par son rôle antioxydant et l'inhibition de la signalisation d'IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*). Il a été mis en évidence dans de nombreux modèles de cancer que KL a des propriétés de suppresseur de tumeur. L'exploitation de bases de données montre que l'expression de *KL* est associée à une meilleure survie des patients atteints de LPS et qu'elle est réduite dans les tumeurs de DDLPS par rapport au tissu sain.

Afin de valider l'hypothèse d'un rôle suppresseur de tumeur de KL dans les DDLPS, nous avons testé l'effet de sa surexpression sur plusieurs phénotypes tumorigéniques. KL, d'une part, réduit la prolifération et la clonogénicité des cellules, et d'autre part, sensibilise la lignée de DDLPS à la mort induite par (1) la gemcitabine, une chimiothérapie utilisée sur les sarcomes récurrents ou à évolution métastatique, ainsi que par (2) la thapsigargine (TG), un inducteur du stress calcique du réticulum endoplasmique (RE) par inhibition des calcium (Ca^{2+})-ATPases SERCA.

KL étant décrite comme un régulateur des canaux ioniques, son impact sur l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire a été étudié. La surexpression de *KL* dans la lignée de DDLPS augmente la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire, sensibilisant ainsi au stress réticulaire provoqué par la TG et par la gemcitabine. Cette fuite de Ca^{2+} fait intervenir le translocon (TLC) ainsi que le canal calcique membranaire TRPC6 (*Transient Receptor Potential Canonical 6*), qui est maintenu au RE dans les cellules surexprimant *KL*.

Afin d'identifier le(s) mécanisme(s) impliqué(s), la voie de signalisation d'IGF-1R a été étudiée, car impliquée dans la résistance au stress du RE. KL réduit l'activation de la kinase ERK1/2 ainsi que la signalisation calcique induites par IGF-1. Un inhibiteur spécifique d'IGF-1R et du récepteur à l'insuline, le BMS-754807, mime les effets de la surexpression de *KL*, tant au niveau de la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire que de la réponse apoptotique à la TG ou à la gemcitabine.

En perturbant l'homéostasie réticulaire calcique, KL sensibilise les cellules de LPSDD aux drogues entraînant un stress du RE, et ce via la régulation du TLC et de TRPC6. Son action est intracellulaire et passe au moins en partie par l'inhibition de la voie d'IGF-1R. Une forte expression de *KL* dans les tumeurs pourrait donc soit être un marqueur de bonne réponse à certaines chimiothérapies comme la gemcitabine, soit être stimulée par le repositionnement de certains médicaments.

Il semble donc pertinent d'utiliser des agents pharmacologiques perturbant l'homéostasie réticulaire calcique en combinaison avec la gemcitabine dans le traitement des DDLPS. Dans cet esprit, l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263

(navitoclax) a été validée sur cinq lignées de DDLPS. En effet, l'ABT-263 est un BH3-mimétique qui inhibe les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w qui contrôlent les échanges calciques entre le RE et les mitochondries. Cette combinaison est intéressante car elle a déjà été testée en clinique sur une cohorte de patients atteints de tumeurs solides, mais n'a jamais fait l'objet d'essais cliniques sur des patients atteints de DDLPS spécifiquement.

DECIPHERING THE SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN KLOTHO-MEDIATED CHEMOSENSITIZATION OF DEDIFFERENTIATED LIPOSARCOMAS

Scientific abstract

Klotho (KL) is a transmembrane protein encoded by the *kl* gene that was first discovered in a murine model of accelerated aging mutated for this gene. This protein can be shed and also act as a soluble hormone. Its anti-aging properties include protection against oxidative stress and inhibition of the insulin/IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) signaling pathway, two mechanisms shared by numerous models of longevity. The insulin/IGF-1 pathway is important for physiological processes such as glucose metabolism and adipogenesis, in which KL is implicated, but also in pathological contexts such as cancer, in which this signaling pathway is frequently hyperactivated. Consistent with that, it has been demonstrated that KL acts as a tumor suppressor in several cancers.

We investigated the role of KL in liposarcoma (LPS), a rare cancer derived from mesenchymal cells exhibiting an adipogenic differentiation. Indeed, high *KL* expression in LPS tumors is correlated to a better overall survival of patients. Our study focused on dedifferentiated LPS (DDLPS) that are associated with a poor prognosis due to a very high relapse rate and a high resistance to chemotherapy. Moreover, *KL* expression is significantly reduced in DDLPS tumors as compared to adipose tissue.

Intracellular signaling pathways activated by KL remain unclear. Nevertheless, numerous studies report a regulation of ion channels and an inhibition of the IGF-1R (IGF-1 Receptor) pathway, both implicated in chemoresistance and for which inhibitors are under clinical development. We show that *KL* overexpression in a DDLPS cell line reduces its proliferative and clonogenic capacities. Moreover, KL dramatically increases the apoptotic response following long-term treatment (i) with gemcitabine, a chemotherapy used for the management of recurrent or metastatic LPS, and (ii) with thapsigargin (TG), an inhibitor of the reticular Ca^{2+}-ATPases (SERCA pumps) that induces ER (Endoplasmic Reticulum) stress by emptying reticular Ca^{2+} stores. Then, we demonstrate that KL sensitizes DDLPS cells to Ca^{2+}-dependent ER stress by increasing the Ca^{2+}-leakage through the translocon (TLC), the reticular proteic complex implicated in protein translation, and by retaining a pool of TRPC6 (Transient Receptor Potential Canonical 6) channels at the ER. Pretreating cells with BMS-754807, an inhibitor of IGF-1R can mimic the enhanced reticular Ca^{2+}-leakage and apoptosis due to *KL* overexpression. Therefore, we suggest that KL could regulate the TLC- and TRPC6-mediated reticular Ca^{2+}-leakage through IGF-1 signaling inhibition, resulting in a sensitization of DDLPS cells to ER stress-inducing drugs like TG, gemcitabine and navitoclax (ABT-263). Thus, the combination of navitoclax and gemcitabine was tested and also show promising results in inducing cell death even in gemcitabine-resistant DDLPS cell lines.

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance. »

Claude Bernard (1813-1878)

Remerciements

Aux membres du Jury Pr. Jean-Pierre SAVINEAU, Dr. Laurence BIANCHINI, Pr. Pascal REBOUL, Pr. Fabien VAN COPPENOLLE et Pr. Thomas DUCRET

Madame, Messieurs les membres du jury,

C'est pour moi un grand honneur que vous participiez à ce jury. Je tiens sincèrement à vous remercier d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, malgré le temps que cela représente. Votre analyse critique de mes travaux et de ma démarche scientifique contribuera assurément à ma formation scientifique et enrichira les pistes de réflexion sur les sujets abordés dans ce travail. J'espère que vous aurez eu plaisir à lire cette thèse sur la chimiosensibilisation des liposarcomes et que mes développements sur les intrications entre la longévité et les cancers, ainsi que le rôle de l'homéostasie calcique en cancérologie, auront suscité votre intérêt.

A mon directeur de thèse Dr. Pierre VACHER,

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de ces quatre années, dès les stages de Master, alors même que je ne savais pas encore pipeter… Votre intégrité scientifique, votre esprit critique et la liberté intellectuelle que vous accordez à vos étudiants m'ont poussée à poursuivre en thèse sous votre direction. Lorsque vous m'avez parlé de Klotho comme thématique de thèse, sur laquelle tout était à faire, j'ai immédiatement accepté le fait de me lancer dans une aventure complètement nouvelle dont j'allais être l'exploratrice. J'ai apprécié le fait que vous me laissiez tester mes propres hypothèses lorsque c'était possible, même si beaucoup n'ont pas abouti ! Avec le recul, il y a bien des choses que j'aurais faites abordées différemment, mais c'est grâce à l'autonomie que vous m'avez accordée et à vos conseils que je me suis construite et que j'ai gagné en maturité sur le plan scientifique. Votre aide, votre disponibilité et votre expertise précieuse dans la signalisation calcique ont offert un tournant décisif à ce projet.

Aux membres de l'Unité ACTION,

Beaucoup de personnes ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail et ne peuvent toutes être citées, faute de place. Je témoigne ici ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'unité INSERM U1218. Une mention spéciale tout de même,

A Fred CHIBON pour m'avoir gracieusement laissé accès à toutes les lignées de sarcomes et pour ses conseils

A Anne-Marie pour sa bonne humeur, ses conseils, ses coups de main, et la préparation de l'acide pluronique (haha) Profite bien de ta retraite bien méritée !

A Simon toujours prêt à filer un coup de main en cas de pépin… et à rigoler un bon coup avec les anecdotes de la vie du labo (un vrai écosystème). Bonne chance pour la suite !

A Jess pour sa bonne humeur et son « gros l'esprit », des alliés de taille pour survivre à des projets comme Klotho et RCBTB1 !

A Laurence pour ses bons conseils et son soutien

A Jennifer qui, le cœur sur la main, n'hésite pas à consacrer du temps à aider les autres

A Tom pour toutes les fois où je suis venue maudire les statistiques dans son bureau !

A Audrey pour son aide précieuse pour les expérimentations animales

A Sam, dont le départ a laissé un grand vide… Merci de ton soutien inébranlable et de tes précieux conseils ! Tu as été un guide pour la petite stagiaire ninja que j'étais

A Lydia pour tous ses précieux conseils, sa patience et sa bonté. Quand je serai grande je veux être comme toi ! :p

A Mehdi, pour m'avoir prise sous son aile et m'avoir vendue 5 centimes à Olivier ^^

A Ian pour toutes ces heures passées à rigoler (tout en travaillant façon Boulette bien sûr) en dehors de tes heures de sieste et à boire des litres de café bon marché

A Fafa pour sa bonne humeur et son cahier de manips rempli de pépites ! Merci !

A Anaïs pour son sérieux et son application. Klotho demande de la persévérance et tu t'es accrochée ! Félicitations !

A mes amis et à mes proches,

Merci à ceux que j'ai appris à connaître et avec qui j'ai partagé ces dernières années dans l'hostile hémisphère Nord,

En particulier Henwiette qui s'est même laissée envahir par la Réunionnaise pendant un an ! (Allez, la thèse, c'est comme une escape room, mais t'as trois ans pour sortir !)

Merci à celles que je connais depuis si longtemps, Clairousse et Hannah, qui me soutiennent loin des yeux mais près du cœur,

Merci à Michèle et Marie, pour votre précieux soutien. Je suis reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi.

Merci à Kutcha d'être mon coach de vie de fille de l'extrême.

Merci à Papy de croire que je peux faire partie des grains de sable qui peuvent contribuer à rendre le monde meilleur.

Merci à Papa, qui m'a montré qu'un Delcroix pouvait faire des choses pourtant réservées aux gens doués de leurs mains ! ;) Merci de ton soutien indéfectible, de tes conseils (je crois que celui qui m'a été le plus utile est « dans la vie, il faut être tenace ! ») et de ton amour.

Merci à Mutti, toujours présente, infaillible, dont le courage et le dévouement à ceux qu'elle aime abattent tous les obstacles. Même à 10 000km de distance, tu es toujours à mes côtés et je sais que La Licorne n'est jamais trop loin pour galoper à mon secours ! ;)

Merci à Robinou d'être le gentil frère qui pimente ma vie du récit de ses péripéties et qui comprend l'enfer du quotidien d'un Delcroix ! « Êtes-vous classé dans la catégorie humain ? - Négatif, je suis une mite en pullover. »

Merci à ma Wowowe, ma douce, de m'aider et me soutenir, de toujours rester forte en prenant à cœur son rôle de grande sœur, j'espère toujours être digne de l'estime dont tu m'honores.

En bref, « j'aimerais soutenir ma famille qui m'a beaucoup remerciée » (seuls quelques élus comprendront).

Enfin, merci à mon Olivier d'être mon partenaire de vie, mon meilleur allié... Tu étais là dans les moments difficiles et dans les événements heureux. Sans ton aide il est certain que je ne serais pas arrivée où j'en suis. Tu fais partie de mes forces vives, merci d'être à mes côtés pour venir à bout de toutes les difficultés. J'ai hâte que notre duo de choc parte à la conquête de nouveaux défis !

Table des matières

INTRODUCTION 16

Chapitre 1 : Les liposarcomes dédifférenciés, des tumeurs rares et hétérogènes difficiles à soigner 17

I. Diagnostic et spécificité des liposarcomes au sein des sarcomes des tissus mous 17

1) Les sarcomes des tissus mous : un groupe très hétérogène 17

2) Les liposarcomes sont classés en cinq sous-types histologiques, associés à des pronostics différents 20

II. Le traitement des liposarcomes : un défi à relever 24

1) Prise en charge thérapeutique actuelle des sarcomes des tissus mous 24

2) Les mécanismes de résistance aux chimiothérapies 28

3) Stratégies thérapeutiques en cours de développement 36

Chapitre 2 : Klotho, un gène de longévité au service de la lutte contre le cancer 39

I. Expression et régulation de Klotho 40

1) Du gène de longévité à la protéine sécrétée 40

2) Régulation physiologique de l'expression de KL 42

3) Variants du gène KL et altération de son expression : des anomalies physiologiques aux pathologies cancéreuses 43

II. Fonctions systémiques et cellulaires de Klotho 47

1) Klotho est essentielle à l'homéostasie minérale de l'organisme 47

2) Klotho inhibe la signalisation de récepteurs impliqués dans l'espérance de vie et les processus oncogéniques 52

3) La modulation des voies de signalisation par Klotho offre une protection contre divers stress et améliore le fonctionnement de certains organes 63

III. Au travers de l'ensemble de ses fonctions, Klotho agit comme un suppresseur de tumeur 67

1) L'expression de KL est altérée dans de nombreux cancers et corrélée aux données cliniques. 68

2) Klotho exerce son rôle suppresseur de tumeur via l'inhibition des facteurs de croissance 70

3) Autres effets de Klotho sur la signalisation de la cellule cancéreuse 73

Chapitre 3 : Le calcium, un messager ubiquitaire dont la signalisation est altérée dans la cellule tumorale 76

I. Dans la cellule saine, le calcium est un messager finement contrôlé 76

1) Le maintien du gradient électrochimique du Ca^{2+} 77

2) Mécanismes à l'origine des signaux calciques cytosoliques 80

3) Le signal calcique est codé en amplitude, dans le temps et dans l'espace 88

II. Le remodelage de la signalisation calcique dans la cellule cancéreuse 92

1) Le maintien des signaux prolifératifs 93

2) La dédifférenciation 95

3) La migration et l'invasion 96
4) La résistance à l'apoptose 99
5) La vascularisation tumorale 104
6) L'immortalité réplicative et le détournement de la sénescence 104
7) Echappement au système immunitaire 105
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 110
MATERIEL ET METHODES 111
Les méthodes d'imagerie du Ca^{2+}, cytosolique ou mitochondrial 112
Outils pharmacologiques 127
Lignées cellulaires 128
Etablissement des modèles cellulaires de surexpression de KL par infection lentivirale 128
Western blot 130
Test de prolifération cellulaire 131
Test de clonogénicité 131
Test de viabilité MTT 132
Cytométrie en flux 132
- Marquage TMRM 132
- Marquage AnnexinV/PI 133
- Marquage avec la sonde H_2DCFDA 133
- Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium 133

Suivi du niveau de ROS intracellulaire par vidéomicroscopie 134
Marquage de l'activité β-galactosidase 134
In vivo 135
Analyses statistiques 135
RESULTATS 136
Partie 1 : Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés 137
The anti-ageing protein Klotho sensitizes Dedifferentiated Liposarcoma cells to apoptosis by increasing ER Calcium leak and inhibiting MAPK signaling 138
Abstract 138
Introduction 139
Results 141
1) In the DDLPS cell line, Klotho reduces IGF-1R-dependent signaling 141
2) KL overexpression in a DDLPS cell line decreases its tumorigenic phenotypes 141
3) KL-overexpression sensitizes DDLPS to ER stress by disrupting intracellular Ca^{2+} homeostasis. 142
4) In DDLPS cells, Klotho promotes reticular Ca^{2+} leakage and apoptosis by opening the translocon. 143

5) Klotho regulates drug sensitivity and reticular Ca^{2+}-leakage by inhibiting ERK1/2 signaling 145
6) KL expression is altered in DDLPS tumors and has a prognostic value for liposarcoma patients 146
Discussion 147
Materials and Methods 147
REFERENCES 153
Résultats complémentaires 173
1) Contrôle de potentiels artefacts 173
2) Autres canaux de fuite du RE modulés par Klotho 176
3) Devenir du Ca^{2+} réticulaire : évolution du Ca^{2+} mitochondrial 183
4) Rôle antioxydant de Klotho sur la génération de ROS induite par la TG et la gemcitabine ... 184
5) Rôle de Klotho soluble (KLs) dans la sensibilité des cellules IB115 au stress réticulaire 189
6) Confirmation des effets de Klotho dans d'autres lignées de DDLPS 195
Partie 2 : Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la chimiorésistance des DDLPS à la gemcitabine 201
1) Evaluation de la sensibilité des lignées de DDLPS à la gemcitabine 203
2) Etude de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans les lignées de DDLPS 205
3) Effet de la combinaison de l'ABT-263 et de la gemcitabine sur la mort cellulaire in vitro 207
4) Effet de la combinaison de l'ABT-263 et de la gemcitabine sur la croissance tumorale in vivo 210
5) Evaluation de l'implication éventuelle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-263 214
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 217
Discussion et perspectives sur le rôle de Klotho dans la chimiorésistance des DDLPS 218
1) Rôles respectifs des formes solubles et membranaire de Klotho 218
2) Rôle de la séquestration de TRPC6 par Klotho 219
3) Mécanismes par lesquels Klotho régule la fuite calcique réticulaire par TRPC6 et le translocon 220
4) Mécanismes de l'inhibition de ERK1/2 par Klotho 222
5) Impact de la fuite réticulaire de Ca^{2+} induite par Klotho sur le métabolisme 224
Discussion et perspectives sur le rôle des anti-apoptotiques dans la résistance des DDLPS à la gemcitabine 225
DISCUSSION GENERALE 230
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 237
ANNEXES 264

TABLE DES ILLUSTRATIONS

***Figure 1** : Taxonomie des sarcomes 19*
Figure 2** Distribution des différents sous-types histologiques de LPS en termes de prévalence et introduction des caractéristiques cliniquesqui leur sont associées..... **Erreur ! Signet non défini.
***Figure 3** : Recommandation des chimiothérapies à utiliser dans le traitement des sarcomes 26*
***Figure 4** Présentation des deux voies majeures de l'apoptose. 30*
***Figure 5** Présentation des membres de la famille Bcl-2 selon leur rôle dans l'apoptose et la composition de leurs domaines d'homologie BH. 31*
***Figure 6** Les voies de signalisation des facteurs de croissance convergent vers l'activation de PI3K/Akt et la voie des MAPK. 33*
***Figure 7** La famille des récepteurs à l'insuline inclut deux isoformes du récepteur à l'insuline (IR-A et IR-B), le récepteur à l'IGF de type 1 (IGF-1R) et le récepteur IGF-2R. 34*
***Figure 8** Structure et zones de clivage de la protéine humaine Klotho 40*
***Figure 9** Différents mécanismes de la production de Klotho soluble : par clivage et épissage alternatif 41*
***Figure 10** Expression de KL par RNAseq dans les tissus humains. 43*
***Figure 11** Localisation des différents SNPs répertoriés dans le gène KL 44*
***Figure 12** Régulation de la phosphatémie par la signalisation Klotho-FGF23 et le dialogue hormonal entre les différents tissus. 49*
***Figure 13** Dans le tubule rénal proximal, la réabsorption des phosphates est réduite 50*
***Figure 14** Dans le tubule contourné distal, la réabsorption de Ca^{2+} est stimulée par le calcitriol et l'augmentation de la présence de canaux TRPV5 à la membrane apicale 51*
***Figure 15** Voies de signalisation activées par les ligands insuline et IGFs 53*
***Figure 16** Présentation des orthologues de l'axe GH/IGF-1 chez les nématodes et les insectes. 55*
***Figure 17** Schéma des différentes mutations affectant les voies de signalisation de l'axe GH/IGF-1 chez les mammifères. 55*
***Figure 18** Klotho favorise la résistance au stress oxydatif en levant l'inhibition de FOXO exercée par AKT 57*
Figure 19** Interactome de la voie insuline/IGF-1-FOXO dans la longévité. ..... **Erreur ! Signet non défini.
***Figure 20** Le stress réticulaire active les trois bras de l'UPR 59*
***Figure 21** La fixation d'un ligand Wnt sur le complexe Frizzled (FZD)-LRP5/6 empêche la dégradation de la β-caténine 60*
***Figure 22** Klotho régule de nombreuses voies de signalisation grâce aux interactions avec son domaine KL1, KL2, les deux domaines à la fois ou via son activité sialidase. 63*
***Figure 23** Klotho améliore la cognition en enrichissant les synapses des neurones de l'hippocampe en récepteurs NMDA et sous-unités GluN2B 65*
***Figure 24** Klotho exerce un rôle suppresseur de tumeur en inhibant les voies des facteurs de croissance impliquées dans des processus oncogéniques. 75*
***Figure 25** Vue d'ensemble des mécanismes de chélation, d'extrusion et de compartimentalisation du Ca^{2+} 79*
***Figure 26** Structure d'un tétramère TRPC3/C6 et des sous-unités qui le composent. 82*
***Figure 27** Régulation de l'activité de TRPC6 et de sa présence à sa membrane) 83*
***Figure 28** La perméabilité du translocon au Ca^{2+} est contrecarrée par le polypeptide en cours d'élongation et la protéine chaperonne BiP 85*
***Figure 29** L'influx de Ca^{2+} par Orai1 recrute la PKC au complexe initié par CD95 et retarde l'activation des caspases faisant partie du DISC 87*
***Figure 30** Blip, puff et vague calcique (wave) générés par l'IP3R 89*
***Figure 31** A l'état basal, le Ca^{2+} est expulsé par la PMCA et compartimentalisé par la SERCA et les mitochondries. Lorsqu'un signal calcique est généré, sa signature permet d'activer des réponses rapides 90*
***Figure 32** Organisation et régulation des acteurs moléculaires des MAMs 91*
***Figure 33** Les grandes caractéristiques de la cellule tumorale 93*
***Figure 34** Le remodelage des transporteurs du Ca^{2+} par rapport à la cellule normale 94*
***Figure 35** Régionalisation des canaux calciques et de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire lors du processus de migration métastatique 97*

Figure 36 *L'activation canonique du récepteur à domaine de mort CD95 par son ligand transmembranaire induit l'activation des voies de l'apoptose. En revanche, la fixation de la forme clivée soluble de son ligand active une voie pro-motile* 98
Figure 37 *L'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ active l'apoptose par la calpaïne, lève l'inhibition du pro-apoptotique Bad et participe à la surcharge calcique mitochondriale* 99
Figure 38 *Interactions entre la famille Bcl-2 et les voies anti- ou pro-apoptotiques activées par le stress réticulaire* 102
Figure 39 *Le stress du RE, induit par l'altération de l'homéostasie calcique intracellulaire, active à la fois des voies pro-autophagiques et des voies pro-apoptotiques* 103
Figure 40 *Schématisation des principales cellules immunitaires infiltrées dans le microenvironnement tumoral et de leurs rôle pro- et anti-tumoraux respectifs.* 106
Figure 41 *La déplétion du Ca^{2+} réticulaire induit l'apoptose de la cellule par surcharge mitochondriale d'une part, et la mort immunogénique par exposition de la calréticuline à la surface de la cellule d'autre part.* 107
Figure 42 *Aspects de l'homéostasie calcique remodelés dans la cellule cancéreuse.* 109
Figure 43 *Schéma du plasmide utilisé pour l'établissement des modèles de surexpression du gène KL* 128
Figure 44 *Proportion de cellules apoptotiques dans les lignées établies avec ou sans sélection à la puromycine* 173
Figure 45 *Effet de la surexpression d'une protéine membranaire sur la réponse calcique à la TG, à la puromycine et sur la réponse apoptotique à la TG ou la gemcitabine dans les cellules IB115.* 175
Figure 46 *L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 à la membrane plasmique est nécessaire à la réponse calcique induite par IGF-1* ..... ***Erreur ! Signet non défini.***
Figure 47 *La stimulation des cellules IB115 avec l'OAG met en évidence une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire uniquement dans les celles surexprimant KL* 177
Figure 48 *L'implication de TRPC6 dans la réponse à l'OAG et la fuite du Ca^{2+} réticulaire des cellules IB115-KL est confirmée par l'utilisation de son activateur et son inhibiteur spécifiques dans un milieu sans Ca^{2+} extracellulaire.* 178
Figure 49 *Impact de l'inhibition de TRPC3 et TRPC6 sur la réponse à l'OAG dans les cellules IB115-KL en absence de Ca^{2+} extracellulaire.* 179
Figure 50 *Effet de l'inhibition d'IGF-1R ou de MEK sur la réponse à l'OAG des cellules IB115-vecteur vide en absence de Ca^{2+} extracellulaire* 179
Figure 51 *Etude par western blot de l'impact de la TG et de la gemcitabine sur l'expression de TRPC6 après 48h de traitement.* 180
Figure 52 *Effet du larixyl acetate sur la mort cellulaire induite par la TG ou la gemcitabine.* 181
Figure 53 *Conséquences de la fermeture du translocon sur l'activité de TRPC6 et réciproquement, de l'activité de TRPC6 sur l'ouverture du translocon.* 182
Figure 54 *Evolution de la $[Ca^{2+}]$ cytosolique relative après ajout de 1µM de CCCP en absence de Ca^{2+} extracellulaire* 183
Figure 55 *Evolution de la $[Ca^{2+}]$ mitochondriale relative après ajout de 10nM de TG en absence de Ca^{2+} extracellulaire* 184
Figure 56 *Evolution relative des ROS intracellulaires lors de l'application de TG puis de l'ajout de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement* 185
Figure 57 *Evolution des ROS dans les cellules après l'application de TG, puis d'inhibiteurs des ROS, le DPI et le NAC* 186
Figure 58 *Intensité moyenne de fluorescence (MFI) relative de la sonde H_2DCFDA analysée par cytométrie en flux après 56h d'incubation avec la gemcitabine* 187
Figure 59 *Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et un marquage à l'iodure de propidium après 32h de traitement avec 100nM de gemcitabine* 188
Figure 60 *Observation des lignées au grossissement x100 en contraste de phase et au grossissement x200 par coloration de l'activité β-galactosidase* 189
Figure 61 *Comparaison des effets des formes membranaire ou solubles sur la réponse calcique à 20nM d'IGF-1 en présence de 2mM de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement.* 190
Figure 62 *Etude par western blot de l'activation par phosphorylation des acteurs de la voie de signalisation de la voie IGF-1R après 1h de stimulation avec IGF-1, dans des cellules contrôles, prétraitées avec le BMS-754807 ou des cellules IB115-vecteur vide prétraitées 24h avec KLs.* 191

Figure 63 *Estimation du contenu réticulaire en Ca^{2+} dans les cellules IB115-vecteur vide, avec ou sans 24h de prétraitement avec KLs, avec application de (A) TG ou (B) ionomycine.* *192*
Figure 64 *Etude de la fuite passive du Ca^{2+} réticulaire par TRPC6 (A, B) et par le translocon (C) dans les cellules IB115-vetceur vide, avec ou sans prétraitement avec chacune des formes KLs* *193*
Figure 65 *Proportion de cellules mortes dans la lignée IB115 prétraitée avec KLs ou surexprimant la forme membranaire de Klotho après un traitement de 48h avec la TG* *194*
Figure 66 *Les formes solubles de Klotho n'ont pas d'effet sur l'apoptose induite par la gemcitabine* *194*
Figure 67 *Validation de l'expression de KL par western blot* *195*
Figure 68 *La surexpression de KL sensibilise la lignée IB143 à 96h de traitement avec la gemcitabine* *195*
Figure 69 *La surexpression de KL sensibilise à l'apoptose induite par la TG* *196*
Figure 70 *Réponses calciques intracellulaires de la lignée IB143, infectée pour surexprimer KL ou prétraitée avec KLs, à l'application de 1µM de TG* *196*
Figure 71 *Validation par western blot de l'expression de KL dans la lignée IB111* *197*
Figure 72 *La surexpression de Klotho sensibilise à la mort induite par la thapsigargine (TG), mais pas à la gemcitabine (GM)* *197*
Figure 73 *Etude de l'homéostasie calcique intracellulaire de la lignée IB111, exprimant le vecteur vide ou KL.* *198*
Figure 74 *Réponse calcique des lignées IB111 à la stimulation avec l'IGF-1 (20nM).* *199*
Figure 75 *Potentiel thérapeutique du ciblage des SERCA dans les LPS.* *200*
Figure 76 *Résultats de puces protéiques en phase reverse (RPPA) pour étudier l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL dans les STM en fonction du statut métastatique* *202*
Figure 77 *Mesure de la viabilité cellulaire des lignées de DDLPS en fonction de la concentration de gemcitabine, par test MTT* *204*
Figure 78 *Etude par western blot de l'abondance protéique de Bcl-2 et Bcl-xL dans les différentes lignées de DDLPS* *205*
Figure 79 *Mesure de la mort cellulaire par marquage TMRM dans les lignées de DDLPS traitées avec la combinaison de l'ABT-199 et de la gemcitabine* *206*
Figure 80 *Etude de l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine (GM) et de l'ABT-263 dans les lignées cellulaires de DDLPS par un marquage TMRM analysé par cytométie en flux* *207*
Figure 81 *Etude de l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine (GM) et de l'ABT-263 dans les lignées cellulaires de DDLPS par un marquage AnnexineV/PI* *209*
Figure 82 *Design expérimental des pré-tests de toxicité in vivo* *211*
Figure 83 *Design expérimental du test de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 in vivo* *212*
Figure 84 *Evolution du volume tumoral au cours du traitement* *212*
Figure 85 *Poids des tumeurs résiduelles après sacrifice* *213*
Figure 86 *Poids des souris de chaque groupe à la fin du traitement* *214*
Figure 87 *Effet de l'inhibition de Mcl-1 sur la mort cellulaire induite par la gemcitabine ou sa combinaison avec l'ABT-263, mesuré par un marquage TMRM* *215*
Figure 88 *Etude par western blot de l'expression de Mcl-1 dans les lignées de DDLPS* *216*
Figure 89 *L'ABT-263 n'a pas d'effet notable sur la sensibilité d'une lignée de sarcome indifférencié à la gemcitabine* *2277*
Figure 90 *La surexpression de KL potentialise la réponse apoptotique de la lignée IB115 à la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 à faible dose* *2288*
Figure 91 *Schéma-bilan de l'action de Klotho dans la cellule de DDLPS et de l'action des principaux outils pharmacologiques utilisés* *22929*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 *Eléments régulateurs de l'expression du gène KL 42*
Tableau 2 *Résumé des publications concernant les individus homozygotes (Hom) ou hétérozygotes (Het) pour le polymorphisme KL-VS 46*
Tableau 3 *Présentation des différents modèles animaux dont la mutation de l'axe GH/IGF-1 confère une résistance au stress 56*
Tableau 4 *Principaux phénotypes obtenus après modulation de l'expression de KL dans des lignées cancéreuses 71*
Tableau 5 *Liste des agents pharmacologiques utilisés au cours des expérimentations..... 127*
Tableau 6 *Présentation des différents anticorps utilisés. 130*

ABREVIATIONS

$[Ca^{2+}]$cyt : concentration calcique cytosolique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AM : AcetoxyMethyl ester
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine Triphosphate
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large
BiP : Binding Immunoglobulin protein
BSA : Bovine Serum Albumin
CaMKII : Protéine kinase Ca2+/calmoduline-dépendante
CD95 : Cluster of Differentiation 95
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CHOP : C/EBP homologous protein
CRAC : Calcium Release-Activated Calcium Channel protein
DAG : Di-Acyl Glycérol
DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma
ECC : Entrée capacitive de Calcium
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA : Ethylene Glycoltetraacetic Acid
eIF2α : Eukaryotic translation initiation factor 2A
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FOXO : class O of forkhead box transcription factors
GFP : Green Fluorescent Protein
GH : Growth hormone (somatotropine)
GIST : Gastro-Intestinal Stromal Tumor
GM : Gemcitabine
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
IGF-1R : Insulin-like Growth Factor-1 Receptor
IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IP3 : Inositol 1,4,5-triPhosphate
IP3R : Récepteur à l'IP3
IP3R : Récepteur de l'Inositol 1,4,5-TriPhosphate
IR : Insulin Receptor
KL : Klotho
KLs = sKlotho = Klotho soluble
LPS : liposarcome
DDLPS: Liposarcomes Dédifférenciés
MAM : Mitochondria-Associated ER Membranes
MAPK : Mitogen Activated Proteins Kinase
Mcl-1 : induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCU : Mitochondrial Calcium Uniporter
MDM2 : Murine Double Minute 2 homolog
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NO : Nitric Oxide
OAG : 1-oleolyl-2-acetyl-sn-glycerol
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PDAC : Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma
PI : iodure de propidium
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PIP2 : Phosphatidyl Inositol diphosphate
PKC : Phospho-Kinase C
PLC : PhosphoLipase C
PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTH : parathormone
PTP : mitochondrial Permeability Transition Pore
RE : Reticulum Endoplasmique
ROC : Receptor Operated Channel
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
RyR : Ryanodine Receptor
SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase
SMOC : Second Messenger-Operated Channels
SOC : Store-Operated Channel
STIM1 : STromal Interaction Molecule
STM : Sarcomes des tissus mous
TG : Thapsigargine
TGF : Transforming Growth Factor
TLC: translocon
TMRM : Ester Méthylique de Tétraméthylrhodamine
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRPC : Transient Receptor Potential Channel
TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloide
UPR : Unfolded Protein Response
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VOC : Voltage-Operated Channel
XBP-1 : X-Box Binding Protein 1

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les liposarcomes dédifférenciés, des tumeurs rares et hétérogènes difficiles à soigner

I. Diagnostic et spécificité des liposarcomes au sein des sarcomes des tissus mous

1) Les sarcomes des tissus mous : un groupe très hétérogène

Les sarcomes des tissus mous (STM) désignent l'ensemble des tumeurs malignes d'origine mésenchymateuse mais non osseuse, ce qui en fait un groupe de tumeurs très hétérogènes [1]. En effet, les STM peuvent se développer à partir des tissus musculaires, adipeux, nerveux, fibreux, des vaisseaux sanguins… Ils peuvent donc potentiellement être localisés dans n'importe quelle partie du corps, bien que les membres soient majoritairement affectés (50%), suivis par le tronc et l'abdomen (40%), tandis que les sarcomes de la tête et du cou ne concernent que 10% des cas. Les STM sont des tumeurs rares : ils représentent moins de 1% des cas [2] de cancer chez l'adulte et 4% à 8% des cas chez l'enfant [3]. Leur rareté et leur hétérogénéité en font des tumeurs difficiles à diagnostiquer et à traiter.

a) Etiologie

A l'heure actuelle, l'étiologie des sarcomes demeure inconnue. Néanmoins, certains facteurs ont été décrits comme augmentant l'incidence des sarcomes. On distingue quatre types de facteurs de risque principaux :

- **Irradiations** : Suite à des traitements de tumeurs par radiothérapie à des doses supérieures à 50 Gy, on note une augmentation de l'apparition de sarcomes en territoire irradié[4]
- **Environnementaux** : Ils concernent notamment les agriculteurs, qui sont exposés à certains chlorophénols et herbicides [5,6]
- **Immunitaires** : Chez l'humain, le virus de l'herpès 8 est impliqué dans le développement du sarcome de Kaposi [7]
- **Génétiques** : On observe une augmentation de l'incidence des sarcomes desmoïdes chez les patients atteints de la polypose adénomateuse familiale par rapport à la population générale[8].

b) Survie

De manière générale, les patients atteints de sarcomes ont une survie faible à 5 ans (57%). Cependant, cette notion est à nuancer en fonction de plusieurs critères :

- **L'âge** : la probabilité de survie à 5 ans est de 69% pour les personnes âgées de 15 à 45 ans, contre 41% pour les patients de plus de 75 ans[9].
- **Le type histologique** de la tumeur.
- **Le niveau de différenciation** des cellules tumorales : dans la plupart des cas, les tumeurs peu différenciées sont plus agressives que les tumeurs bien différenciées.
- **La localisation** : les tumeurs rétropéritonéales sont associées à un taux de survie plus faible, notamment du fait de la difficulté de leur diagnostic et de leur prise en charge chirurgicale.
- **Le remaniement génétique** : les tumeurs ayant un génome fortement remanié sont significativement associées à une plus grande probabilité d'évolution métastatique [10].

c) Estimation du risque métastatique

Le facteur péjoratif majeur de toute tumeur est l'évolution métastatique car, dans la majorité des cas, elle entraîne le décès du patient. Il est donc indispensable de pouvoir déterminer le plus précocement possible le risque d'apparition des métastases afin d'adapter la prise en charge. Pour cela, trois critères permettant d'obtenir un score ont été établis :

- **La différenciation tumorale** : Différencié (1) à indifférencié (3)
- **L'index mitotique** : Peu de mitoses (1) à beaucoup de mitoses (3)
- **La nécrose tumorale** : Absence de nécrose (0) à nécrose > 50% (2)

En fonction de ce score, le pathologiste peut déterminer le grade de la tumeur :

- **Grade 1** : score de 2 à 3 : risque métastatique faible
- **Grade 2** : score de 4 à 5 : risque métastatique réel
- **Grade 3** : score de 6 à 8 : risque métastatique élevé

A noter que ce système n'utilise pas les données génétiques. Or, de plus en plus d'études montrent l'importance de certaines anomalies génétiques dans l'évolution métastatique des tumeurs. En effet, l'équipe du Dr. Frédéric CHIBON (INSERM U1218) a montré que les patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST, *GastroIntestinal Stromal Tumors*) pouvaient être classés en fonction de leur Index Génomique (GI, *Genomic Index*)

défini par $GI = \frac{\text{Nombre d'altérations génomiques (gains ou pertes)}^2}{\text{Nombre de chromosomes altérés}}$. Ceux ayant un GI > 10 étaient significativement associés à une plus grande probabilité de survenue des métastases. Jusque-là, les patients concernés appartenaient à un groupe intermédiaire pour lequel les systèmes de stratification classiques ne permettaient pas d'appréhender le risque de progression métastatique [11].

d) Classification

Les STM représentent donc une vaste famille de tumeurs à la fois rares et hétérogènes, que seules les analyses histologiques et moléculaires parviennent à classer en différents sous-types histologiques. Cette classification est essentielle pour déterminer le pronostic et la prise en charge du patient.

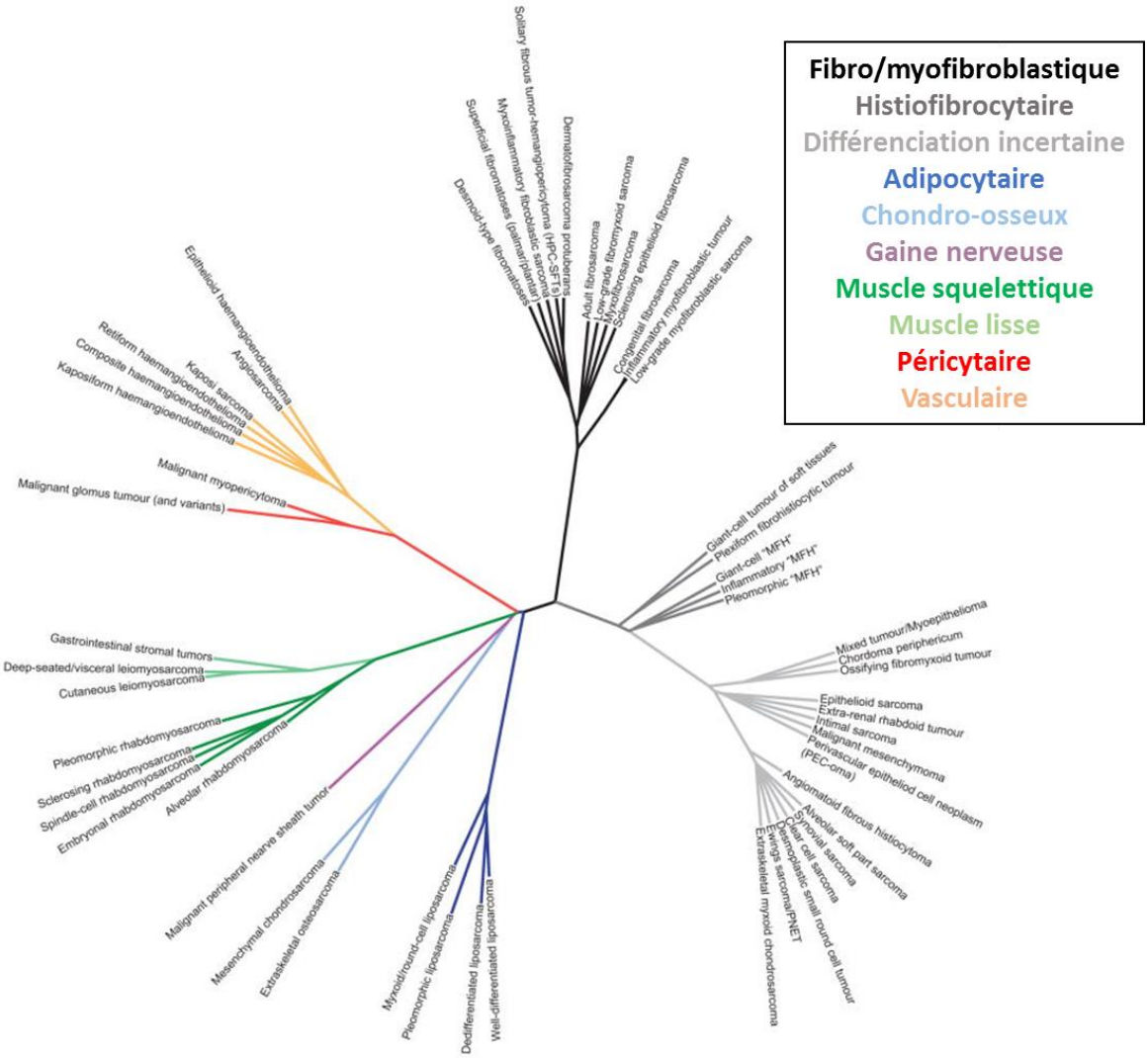


Figure 1 *: Taxonomie des sarcomes (Adapté de Taylor et al, Nat Rev Cancer, 2011)*

Au niveau anatomopathologique, les sarcomes sont classés en fonction de leur localisation, de leur morphologie et d'une ligne de différenciation éventuelle identifiée par des marqueurs immunohistochimiques.

Les STM les plus fréquents et présentant une ligne de différenciation sont les liposarcomes, les léiomyosarcomes et les synovialosarcomes. Cependant, 30% des sarcomes ne présentent pas de ligne de différenciation identifiable au niveau histologique [1].

Depuis les années 1990, la cytogénétique associée au développement de la biologie moléculaire a pu affiner cette classification, notamment en caractérisant certains sarcomes par des anomalies génétiques. L'exemple le plus marquant date de 2004, où 20% des sarcomes indifférenciés (selon les caractéristiques anatomopathologiques) ont été reclassés en liposarcomes dédifférenciées, car ils présentaient une amplification des gènes MDM2 et CDK4, une anomalie typique des liposarcomes [12].

2) Les liposarcomes sont classés en cinq sous-types histologiques, associés à des pronostics différents

Les liposarcomes (LPS) sont des tumeurs malignes issues de cellules ayant initié une différenciation adipocytaire. Il s'agit du sous-type le plus communément diagnostiqué, car ils représentent environ 20% des cas de STM [13].

a) Historique

Initialement décrites en 1857 par Virchow, ces tumeurs présentaient une biologie atypique, comme en témoigne cette citation d'Arthur Purdy en 1944 :

« Sûrement, l'un des chapitres les plus bizarres et fantastiques de l'histoire de l'oncologie est le liposarcome. L'étrange façon qu'ils ont de grandir, leur taille stupéfiante, semblable à aucune autre tumeur, et beaucoup d'autres caractéristiques particulières les rendent d'un grand intérêt. ».

b) Symptômes et diagnostic

Les symptômes d'un liposarcome dépendent principalement de sa localisation et de sa progression. Les zones les plus souvent atteintes sont les membres, en particulier au niveau des cuisses qui représentent plus de 50 % des cas[13]. L'apparition au niveau des membres, du thorax ou de la paroi abdominale est caractérisée par une masse d'évolution plus ou moins rapide, ou d'une tuméfaction pouvant ressembler à un hématome le plus souvent indolore pendant plusieurs mois. Comme les patients ne se sentent pas immédiatement malades, ils ne décident

de consulter un médecin que tardivement. Leur diagnostic et leur traitement sont donc retardés, ce qui participe à la difficulté de prise en charge de ces patients.

Notons toutefois que les liposarcomes peuvent dans certains cas être associés à une douleur (lorsque la tumeur comprime des nerfs ou des organes) et/ou à une augmentation progressive du volume de l'abdomen, entraînant des douleurs et des troubles digestifs quand la tumeur est située dans le rétropéritoine. En effet, un tiers des liposarcomes peuvent se développer dans les viscères et en particulier au niveau du rétropéritoine[14]. Dans ce cas également, la tumeur a tendance à être découverte tardivement car le rétropéritoine peut s'adapter à un changement de volume très important.

Par ailleurs, en plus des cuisses et du rétropéritoine, les liposarcomes peuvent se développer au niveau de la tête et du cou (>5%) et des membres supérieurs (10%)[13].

Après un examen physique approfondi suspectant la présence d'un liposarcome, le premier acte sera de l'imagerie, le plus souvent une radiographie suivie d'une IRM, qui pourra suggérer un diagnostic avant même de réaliser la biopsie en comparant la tumeur avec le tissu adipeux normal pour déterminer le degré de différenciation. Ensuite, le diagnostic sera validé après l'analyse d'une biopsie de l'échantillon tumoral, qui sera soumis à l'étude anatomopathologique et moléculaire afin de déterminer le sous-type histologique, le grade et les éventuelles anomalies génétiques connues. Ces éléments permettront de définir une stratégie thérapeutique en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

La sévérité de la maladie varie considérablement selon le type histologique du liposarcome et va donc entraîner des prises en charge thérapeutiques différentes. Il est donc nécessaire de bien distinguer les différents liposarcomes existants.

c) Classification

Les LPS se divisent eux-mêmes en plusieurs sous-types histologiques, associés à des degrés de différenciation, des pronostics et des altérations moléculaires distincts. Selon la dernière classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)[1], on distingue quatre catégories représentées sur la **Figure 2**.

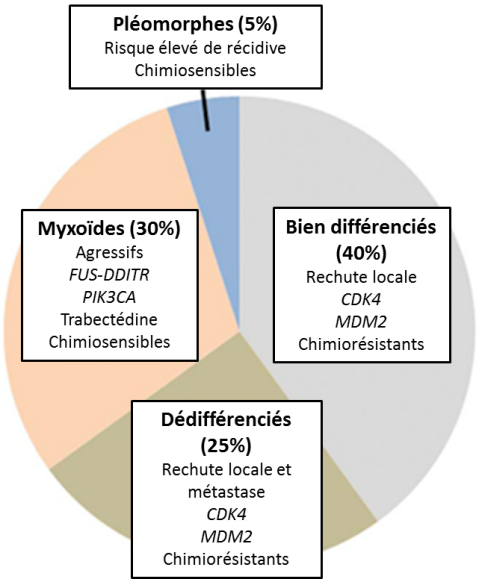


Figure 2 *Distribution des différents sous-types histologiques de LPS en termes de prévalence et introduction des caractéristiques cliniques (altérations moléculaires spécifiques, risque de récidive et sensibilité aux traitements) qui leur sont associées. (adapté de Abbas Manji et al, Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015)*

- **Les tumeurs lipomateuses atypiques (ALT) / les LPS bien différenciés (WDLPS, *well-differentiated liposarcoma*)** : ils présentent une différenciation adipocytaire plus forte que les autres sous-types histologiques et correspondent à des tumeurs localement agressives mais à évolution lente et à très faible risque métastatique, ce qui en fait des tumeurs de plutôt bon pronostic. Dans le cas d'une excision incomplète de la tumeur, le risque d'une rechute locale est élevé et dans 10% des cas, la tumeur résiduelle peut évoluer vers une forme plus agressive, le LPS dédifférencié.

D'un point de vue génétique, ils sont caractérisés par des chromosomes surnuméraires. Ce sont des chromosomes linéaires géants, deux à trois fois la taille du chromosome 1, ou des chromosomes circulaires « en anneau » (« ring chromosomes »). Ils contiennent des séquences du bras long du chromosome 12 et plus particulièrement de la région 12q13-21 [15].

- **Les LPS dédifférenciés (DDLPS, *dedifferentiated liposarcoma*)** : il s'agit de tumeurs de haut grade, qui surviennent soit *de novo* (dans 90% des cas), soit au sein de tumeurs bien différenciées, se traduisant par la transition d'un compartiment riche en adipocytes vers une région non lipogénique composée de cellules fusiformes[1]. Dans la majorité des cas, les DDLPS se développent dans les tissus profonds, notamment au niveau du rétropéritoine. Cette localisation pèse lourdement sur le pronostic, notamment parce qu'ainsi les tumeurs sont diagnostiquées plus tardivement et parce que l'objectif d'une exérèse complète est grandement compliqué du fait de la proximité des organes vitaux et vaisseaux sanguins.

En conséquence, les rechutes locales sont très fréquentes (41 à 57%) et dans 17 à 30% des cas, des métastases se développent [16,17]. En outre, ces tumeurs étant résistantes aux traitements actuels, la chimiothérapie est administrée de façon palliative dans les cas de LPS récurrents ou métastatiques.

Au niveau génétique, l'amplification de MDM2 est systématique et celle de CDK4 très fréquente [18]. Ces tumeurs peuvent également présenter plusieurs chromosomes surnuméraires[19].

L'amplification des régions 1p32 et 6q23 est plus fréquemment retrouvée dans ces tumeurs. Ces régions contiennent notamment les oncogènes JUN et MAP3K5, qui interviennent dans la même voie de signalisation et participeraient à l'oncogenèse, mais pas à la dédifférenciation [12].

- **Les LPS myxoïdes** : Ils sont composés de cellules rondes ou ovales associées à des lipoblastes. Ils représentent 15 à 20 % des LPS et se développent le plus souvent au niveau des extrémités, plus précisément au niveau des tissus profonds de la cuisse. Ils n'affectent que très rarement le rétropéritoine. Un tiers des patients développe des métastases [20].

Dans 95% des cas, ces tumeurs présentent une translocation entre les gènes FUS et DDIT3 [21]. Toutefois, cette altération ne semble pas avoir de valeur pronostique en termes de survie ou d'évolution métastatique [22].

- **Les LPS pléomorphes** : Ce sont des tumeurs de haut grade, ne présentant pas de ligne de différenciation identifiable et caractérisées par un génome très complexe. Ce sont les tumeurs les plus rares (5%) des LPS [23]. Elles sont très agressives, avec des récidives locales et des évolutions métastatiques dans 30 à 50 % des cas. Les patients présentent un taux de survie à 5 ans de 60% [24].

D'un point de vue génétique, ils ressemblent fortement aux sarcomes à génétique complexe. En effet, ils présentent de très nombreux remaniements (gains et pertes) identifiables par CGH array (*Comparative Genomic Hybridization*). Aucune anomalie spécifique n'a encore été mise en évidence à ce jour.

En conclusion, les liposarcomes regroupent plusieurs sous-types histologiques ayant leurs caractéristiques propres. La prise en charge globale actuelle des STM repose sur un socle commun, mais du fait de leur rareté et de leur hétérogénéité, il n'existe pas de réel standard de traitement. Chaque cas est évalué individuellement afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique.

II. Le traitement des liposarcomes : un défi à relever

A l'heure actuelle, le traitement des liposarcomes, comme pour les autres sarcomes, consiste en une prise en charge chirurgicale lorsque la tumeur est localisée. Néanmoins, cette approche peut être complétée avant ou après par de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie.

1) Prise en charge thérapeutique actuelle des sarcomes des tissus mous

a) La chirurgie

Elle a pour objectif d'enlever la tumeur en laissant le moins de résidus possible tout en conservant la fonctionnalité maximale du membre ou de l'organe visé. Après l'opération, et grâce aux données anatomopathologiques, il va être possible de déterminer la qualité de l'exérèse en fonction des marges chirurgicales réalisées :

- **R0** : marge microscopique saine
- **R1** : existence d'un résidu tumoral microscopique
- **R2** : existence d'un résidu tumoral macroscopique

En fonction de ces marges, le patient aura plus ou moins de probabilités de faire une rechute locale. Pour cette raison, si la marge est de type R1 ou R2, il peut être envisagé soit de réaliser une nouvelle exérèse, soit de compléter ce traitement avec de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie.

Dans le cas de la chirurgie des liposarcomes, une distinction est faite en fonction de la localisation. Si la tumeur se situe au niveau des extrémités, une marge de 1cm autour de la tumeur est recommandée et la tumeur doit être retirée en un seul bloc, afin d'éviter une dissémination des cellules tumorales. Cependant, ce n'est pas toujours possible, notamment lorsque la tumeur est proche d'un os ou d'une artère. Dans ce cas, le chirurgien doit éliminer le maximum de tissu tumoral en coupant la tumeur en plusieurs fragments. Cependant, dans certains cas extrêmes, une amputation pourra être envisagée.

Dans le cas des LPS rétropéritonéaux, qui représentent 50% des sarcomes du rétropéritoine [25], lorsque la tumeur a envahi un organe adjacent tel que le colon, la rate et la partie distale du pancréas, la chirurgie consiste en l'exérèse monobloc de la tumeur et d'une partie ou de la totalité de l'organe. Malgré ces précautions, au-delà de 5 années après l'excision macroscopique complète d'un sarcome rétropéritonéal, la rechute locale affecte 60-70% des patients et entraîne généralement leur décès [26].

b) La radiothérapie

Elle peut être réalisée en pré ou post-opératoire :

- **Pré-opératoire** : Elle n'est réalisée que lorsque la tumeur est volumineuse, que la chirurgie présente un risque mutilant ou que des marges de type R1 ou R2 sont envisagées. En effet, la radiothérapie a pour objectif de faciliter le geste chirurgical. Néanmoins, il a été démontré qu'elle augmente les complications au niveau de la cicatrisation (35% contre 17%) [27].
- **Post-opératoire** : Elle n'est envisagée que lorsque la tumeur semble être agressive, c'est-à-dire qu'elle est de grade 2 ou 3, qu'elle est supérieure à 5cm ou qu'elle est profonde.

Dans le cas des LPS, la radiothérapie néoadjuvante n'est utilisée que pour les DDLPS, car les WDLPS n'ont qu'un risque très faible de faire des rechutes métastatiques (moins de 1%)[25].

c) La chimiothérapie

Comme pour la radiothérapie, la chimiothérapie peut être néoadjuvante ou adjuvante. Elle doit être discutée en RCP. Lorsque les sarcomes sont non-métastatiques, la chimiothérapie néoadjuvante est conseillée pour les tumeurs difficilement opérables, afin de diminuer leur volume et de faciliter le geste chirurgical. La chimiothérapie adjuvante sera, quant à elle, prescrite lorsque les tumeurs sont agressives, afin de retarder la rechute locale ou métastatique. Le plus souvent, le traitement sera une combinaison de chimiothérapies incluant une anthracycline (par exemple, la doxorubicine) couplée à l'ifosfamide, un agent alkylant [28].

Concernant la chimiothérapie, il n'existe pas de traitement standard pour les sarcomes. Chaque cas est discuté en RCP pour déterminer la stratégie à suivre.

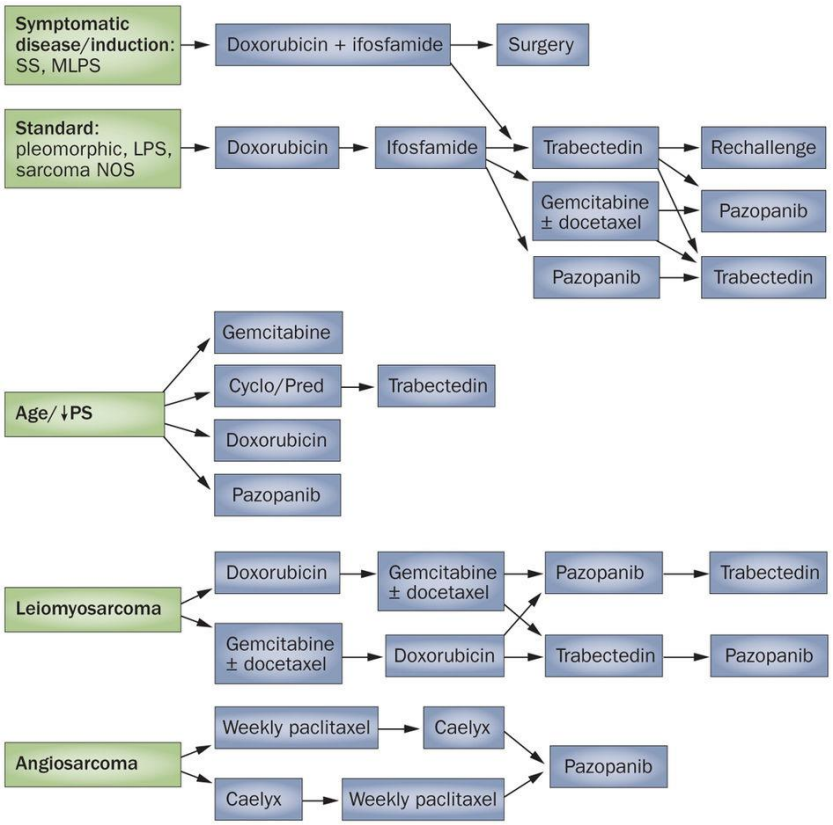


Figure 3 *: Recommandation des chimiothérapies à utiliser dans le traitement des sarcomes (Extrait de Linch et al, Nat Rev Clin Oncol, 2014)*

Sur ce schéma sont indiqués les traitements les plus fréquents en fonction des types histologiques, mais ils ne représentent en aucun cas des standards de traitement puisque celui-ci est décidé au cas par cas et diffère selon les pays.

Concernant les sarcomes métastatiques, la chimiothérapie sera palliative. Les combinaisons seront généralement évitées car elles augmentent la toxicité alors que les études cliniques n'ont pas montré d'augmentation de la survie globale.

Pour les LPS, et notamment pour les DDLPS et les WDLPS, il a été montré que ces tumeurs sont le plus souvent résistantes à ces traitements et les essais n'ont montré aucun bénéfice au niveau de la survie lorsque la chimiothérapie est adjuvante. Lorsqu'elle est prescrite, c'est le plus souvent dans des cas palliatifs pour améliorer la condition du patient.

Nous pouvons noter que pour les patients atteints d'un LPS avancé, non résécable ou métastatique, la chimiothérapie palliative utilisée en première ligne sera la doxorubicine, un intercalant de l'ADN qui inhibe aussi la topoisomérase II [28]. En deuxième ligne de traitement, il pourra être utilisé soit la trabectédine, qui interagit avec le petit sillon de l'ADN et modifie la structure de la double hélice, soit la gemcitabine, un antimétabolite pyrimidique qui s'incorpore

dans l'ADN lors de la phase S, couplée ou non au docetaxel (un anti-mitotique qui inhibe la dépolymériстaion des microtubules), car le bénéfice apporté par le docetaxel est controversé [29]. Ces traitements ne semblent pas augmenter la survie générale des patients, mais permettent de contrôler le volume de la tumeur.

Pour les LPS myxoïdes métastatiques, la trabectédine sera privilégiée, car elle semble particulièrement efficace contre ces tumeurs. Son utilisation en première ligne de traitement a été suggérée sous réserve d'essais cliniques supplémentaires. Cependant, elle n'a pas encore été autorisée, ni aux Etats-Unis, ni en Australie [30].

d) Thérapies ciblées

A l'heure actuelle, il n'existe que deux thérapies ciblées approuvées par l'ESMO dans le traitement des sarcomes. Il s'agit de l'imatinib pour les GISTs métastatiques ou inopérables et du pazopanib pour les sarcomes métastatiques excepté les liposarcomes.

L'imatinib est une molécule compétitrice de l'ATP au niveau des récepteurs codés par les gènes cKIT et PDGFRα (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor A*)[31,32]. Ces gènes sont spécifiquement mutés dans les GISTs et provoquent une augmentation de la signalisation de ces récepteurs impliquée dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires. Ainsi, l'imatinib bloque l'activité de ces récepteurs et provoque donc l'apoptose[33].

Le pazopanib est un inhibiteur des récepteurs à tyrosine kinase pour les facteurs de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et PDGF. Le pazopanib réduit l'angiogenèse et donc indirectement la croissance des tumeurs. Cependant, pour les patients subissant une exérèse large, l'utilisation de cette molécule est déconseillée pour le processus de cicatrisation. De plus, le pazopanib n'a pas montré suffisamment d'efficacité dans le cas des WDLPS et DDLPS pour être testé en essai de phase III [34].

En conclusion, bien que plusieurs stratégies thérapeutiques aient été développées et aient fait leur preuve dans le traitement de certains sarcomes, certains sous-types histologiques comme les DDLPS demeurent réfractaires aux traitements actuels. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes de chimiorésistance qui sont en jeu, afin de proposer aux patients ayant des tumeurs non résécables ou métastatiques une alternative qui leur apporte un réel bénéfice en ce qui concerne la survie.

2) Les mécanismes de résistance aux chimiothérapies

La difficulté majeure que rencontrent les médecins dans le traitement des cancers est la résistance au traitement. Ces mécanismes de résistance peuvent être inhérents à la tumeur ou acquis lors de l'exposition aux médicaments. L'autre aspect, qui concerne notamment les thérapies ciblées, est celui des phénomènes de compensation qui se mettent en place entre des voies de signalisation redondantes.

On distingue principalement cinq grands types de mécanismes de résistance, potentiellement présents dans tous types de cancer :

- **Les mécanismes d'inactivation des drogues**

Certaines molécules chimiothérapeutiques doivent être métabolisées afin d'être activées. Le système des cytochromes P450 participe au métabolisme des médicaments [35]. Des polymorphismes, des altérations ou des mutations des cytochromes peuvent donc influencer l'activation des drogues ainsi que leur excrétion par les reins, avec pour résultat une réduction du taux de drogue active chez le patient.

La superfamille des GST (*Glutathione-S-Transferase*) regroupe des enzymes impliquées dans la détoxification de l'organisme. En conjuguant le glutathion (GSH) au médicament, elles empêchent son entrée dans le noyau de la cellule, le rendent plus hydrophile et donc plus facilement sécrétable. Elles réduisent donc à la fois la toxicité et la quantité de médicament dans la cellule. On constate une élévation du GSH et de l'expression des enzymes GST dans les STM de haut grade et métastatiques ayant été exposés à la doxorubicine [36]. Dans les tumeurs pédiatriques du sarcome d'Ewing, l'expression de la GSTM4 est inversement corrélée à la survie des patients [37].

Enfin, de façon similaire aux GST, on peut évoquer les UGT (*Uridine diphospho-GlucuronosylTransferase*) qui participent à la défense de l'organisme contre les substrats pathogènes et inactivent les molécules cytotoxiques par glucuronidation. L'irinotecan est une pro-drogue utilisée pour le traitement du cancer colorectal et les tumeurs solides pédiatriques (rhabdomyosarcome, sarcome d'Ewing) qui agit en inhibant la Topoisomérase I. Sa forme active SN-38, une fois glucuronidée, a un pouvoir inhibiteur réduit et une plus grande affinité pour les transporteurs MRP qui réalisent l'efflux des drogues hors de la cellule et participent à la chimiorésistance [38].

- **Les mécanismes d'efflux des drogues**

Le transport actif des drogues hors de la cellule fait intervenir des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). Parmi ceux-ci figure Pgp (*P-GlycoProtein,* aussi connue sous les noms MDR1, *MultiDrug Resistance 1,* et ABCB1) dont l'expression dans les STM est plus fréquemment détectée dans les tumeurs de haut-grade (90% de tumeurs positives contre 46% dans les tumeurs intermédiaires et de bas grade) [39]. Elle est corrélée au grade et à une taille importante de tumeur (≥ 5cm) [40]. Sa transcription dans les métastases de STM est rapidement induite par la doxorubicine [41]. L'expression des protéines MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1*) et LRP (*Lung Resistance-related Protein*) serait également corrélée aux grades des tumeurs de STM [42].

L'expression de la Pgp est, entre autres, régulée par la voie des MAPK : Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2, en aval des facteurs de croissance comme EGF (*Epidermal Growth Factor*) et FGF (*Fibroblast Growth Factor*) [43]. Leur activité permet notamment d'extruder les drogues ayant des cibles intracellulaires, comme celles agissant dans le noyau pour engendrer des dommages à l'ADN.

- **Le recrutement des protéines activées par les dommages de l'ADN**

La majorité des molécules cytotoxiques utilisées en chimiothérapie, de même que la radiothérapie, induisent des dommages à l'ADN. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont donc impliqués dans la résistance à ce type de stress cellulaire, ils font partie de la DDR (*DNA Damage Response*).

Les dommages à l'ADN activent la signalisation ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase*)/CHEK1 (Chk1, *checkpoint kinase 1*) et ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*)/CHEK2 (Chk2) lors des phases S et G2/M du cycle. ATM/CHEK2 est également responsable d'un point de contrôle en phase G1. Les deux voies sont activées par des chimiothérapies comme la trabectédine et participent à la résistance des cellules [44]. La protéine HMGA2 (*non-histone chromatin binding protein high mobility group AT-hook 2*) augmente et maintient l'activation de la voie ATR/CHEK1, permettant ainsi un blocage du cycle en G2/M pour la réparation de l'ADN et la survie de la cellule [45]. Il est à noter que le gène *HMGA2* est très fréquemment amplifié dans les WDLPS/DDLPS [46].

Dans une cellule saine, des dommages à l'ADN importants entraînent une cascade de signalisation aboutissant à la mort cellulaire. Un des acteurs majeurs de cette signalisation est

le suppresseur de tumeur p53, muté dans près de la moitié des cancers humains. Dans les liposarcomes WDLPS/DDLPS, l'amplification de MDM2 inhibe l'activité de p53.

En plus de la réponse aux dommages à l'ADN hyperactivée et de l'inactivation de p53, la cellule cancéreuse manifeste donc généralement une forte résistance à l'apoptose par l'altération de la balance entre ses effecteurs et ses inhibiteurs.

- **Les mécanismes d'altération de la balance entre les pro/anti-apoptotiques en faveur des anti-apoptotiques**

L'apoptose est classiquement définie comme un processus de mort programmée, orchestré par une voie intrinsèque ou une extrinsèque (**Figure 4**).

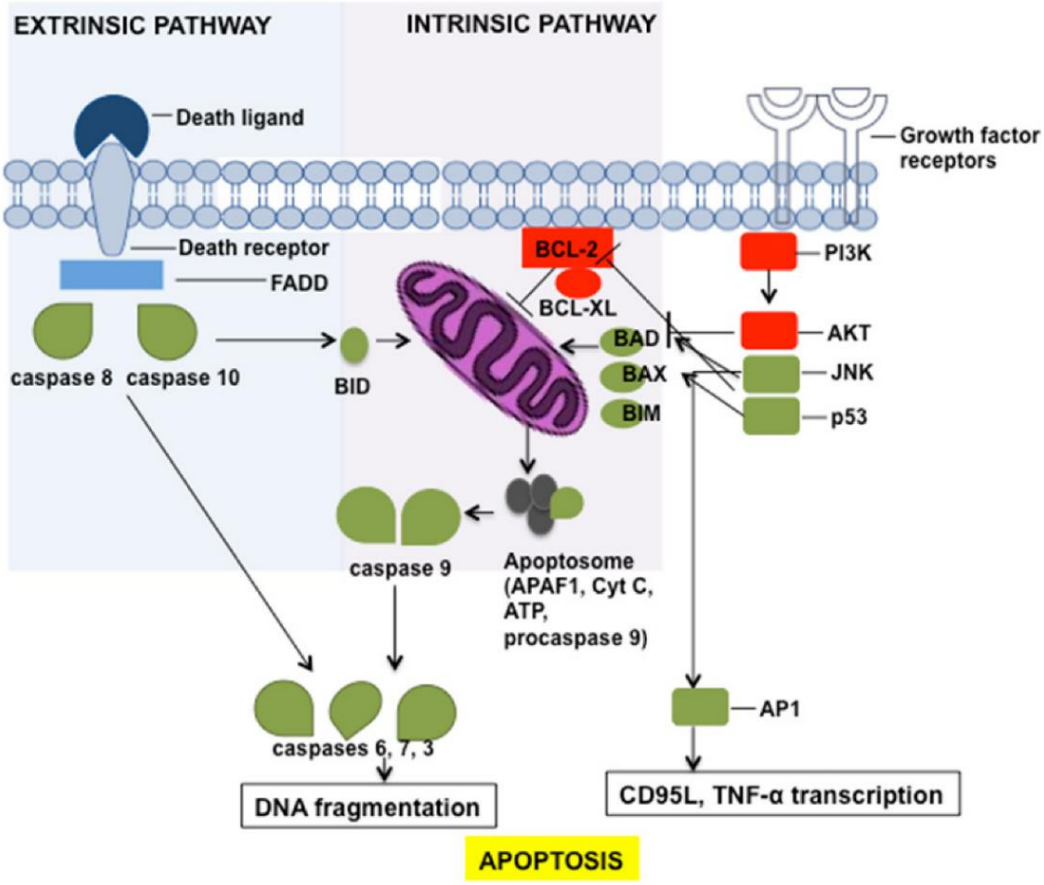


Figure 4 *Présentation des deux voies majeures de l'apoptose. Les protéines pro-apoptotiques sont en vert, les anti-apoptotiques sont en rouge. (extrait de Guissani et al, Int. J. Mol. Sci., 2014)*

La voie extrinsèque de l'apoptose est activée par la fixation d'un ligand sur un récepteur à domaine de mort, qui recrute et active les caspases 8 et 10, dites caspases initiatrices. La voie intrinsèque de l'apoptose est induite sous l'effet de divers stress subis par la mitochondrie, qui libère le cytochrome c (cyt c) dans le cytosol. Avec Apaf1 et la pro-caspase 9, le cyt c forme

l'apoptosome, un complexe qui permet l'activation de la pro-caspase 9. Les caspases 8 et 9 activent par clivage les caspases effectrices (6, 7 et 3), entraînant la fragmentation de l'ADN. Ces voies ne sont pas indépendantes et divers dialogues existent entre elles. Par exemple, l'activation des récepteurs à domaine de mort induit le clivage de Bid, dont la forme tronquée va favoriser l'oligomérisation de Bax et Bak à la mitochondrie, impliquées dans la libération du cyt c. Bax et Bak sont inhibées par Bcl-2 et Bcl-xL, dont l'expression est favorisée par les voies de signalisation des facteurs de croissance.

Les caspases sont responsables de la fragmentation de l'ADN et activent de nombreuses cibles. Il n'est donc pas étonnant que leurs inhibiteurs, les IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), soient impliqués dans la chimiorésistance. Les plus connus sont XIAP et la survivine (BIRC5). Une expression élevée de la survivine dans les STM est un facteur péjoratif de la survie des patients [47] et un screening à haut débit a montré qu'elle était essentielle à la survie des LPS myxoïdes [48]. Une analyse de 140 liposarcomes par puce d'expression a également mis en évidence que la survivine était corrélée à la survie sans métastase [49].

En outre, le ratio entre l'expression des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques est déterminant dans la réponse des cellules aux cytotoxiques [50]. La famille Bcl-2 regroupe des protéines anti-apoptotiques avec 4 domaines d'homologie « BH » (*Bcl-2 homology*), des protéines pro-apoptotiques effectrices avec également 4 domaines BH et enfin les protéines « BH3-only » qui favorisent l'apoptose indirectement, en déplaçant les interactions entre anti- et pro-apoptotiques effecteurs et/ou en activant directement l'oligomérisation de Bax et Bak (**Figure 5**).

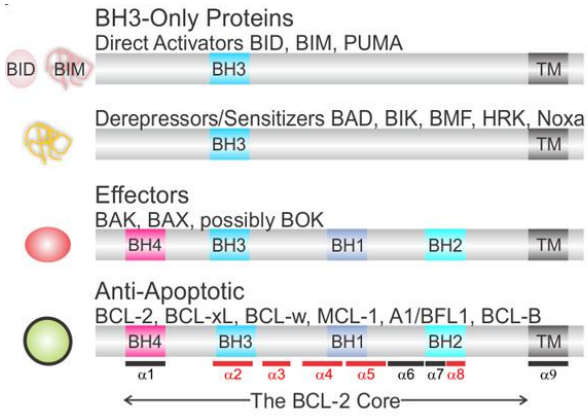


Figure 5 *Présentation des membres de la famille Bcl-2 selon leur rôle dans l'apoptose et la composition de leurs domaines d'homologie BH. On distingue les anti-apoptotiques (notamment Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Mcl-1), les pro-apoptotiques (Bax et Bak) et les protéines BH3-only (Bid, Bim, Bad, PUMA, NOXA…) (extrait de Moldoveanu et al, Trends Biochem. Sci., 2014)*

La dépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est un phénomène largement étudié et connu, commun à de nombreux types de cancer. Les cellules tumorales doivent faire face à divers stress pouvant induire l'apoptose, une forte expression des protéines anti-apoptotiques et une réduction des pro-apoptotiques offrent donc un avantage sélectif. L'hypoxie, par exemple, favorise la réduction de l'expression de Bax, Bak et Bid, ce qui explique en partie que les zones hypoxiques des tumeurs soient également parmi les régions les plus résistantes [51].

Il a été observé dans les STM que l'expression de Bcl-2, Bcl-xL Bad et Bax prises indépendamment n'a aucune valeur pronostique [52]. En revanche, les combinaisons Bad/Bcl-xL, Bax/BclxL Bax/Bcl-2 seraient des facteurs pronostiques indépendants pour la survie des patients présentant des STM de grade 2. En outre, il a été rapporté que la région chromosomique 20q11 codant pour Bcl-xL est une zone de CNV (*Copy Number Variation*) amplifiée dans 77% (10/13) de liposarcomes pléomorphes [53]. Enfin, l'étude par immunohistochimie de 43 léiomyosarcomes a révélé que 77%, 84% et 42% d'entre eux exprimaient fortement Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, respectivement [54].

In vitro, l'étude d'une lignée issue d'un liposarcome métastatique a montré que cette dernière était particulièrement résistante à de nombreuses chimiothérapies (doxorubicine, vinblastine, cisplatine) et exprimait plus fortement Bcl-2 et Bcl-xL, mais plus faiblement Bax, que la lignée cellulaire commerciale SW872 [55].

L'implication des anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la chimiorésistance a initié l'élaboration d'inhibiteurs, dont certains font actuellement l'objet d'essais cliniques : par exemple l'ABT-263 (navitoclax, inhibant Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w) et l'ABT-199 (venetoclax, spécifique de Bcl-2), en agent seul ou en combinaisons avec d'autres médicaments, dans les cancers hématologiques et les tumeurs solides [56]. Il s'agit de BH3-mimétiques, des molécules permettant l'inhibition de l'interaction entre les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques. Dans les STM, l'ABT-737 (équivalent de l'ABT-263) agit en synergie avec la doxorubicine dans les léiomyosarcomes [54] et avec l'imatinib dans les GISTs [57].

Les protéines anti-apoptotiques, les enzymes qui inactivent les médicaments, les transporteurs ABC et les voies de réparation de l'ADN, tous ces mécanismes peuvent être stimulés par les voies de signalisation pro-survie activées par les facteurs de croissance et certaines cytokines.

➢ **L'activation des voies de signalisation pro-survie**

Les voies de signalisation des intégrines et des facteurs de croissance convergent vers les voies de pro-survie de PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)/Akt et de la cascade de signalisation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) : Ras-Raf-MEK-ERK. Des acteurs-clés de ces voies sont fréquemment dérégulés dans les cancers, les sarcomes inclus. C'est pourquoi de nombreuses molécules ont été développées afin d'inhiber cette signalisation (**Figure 6**).

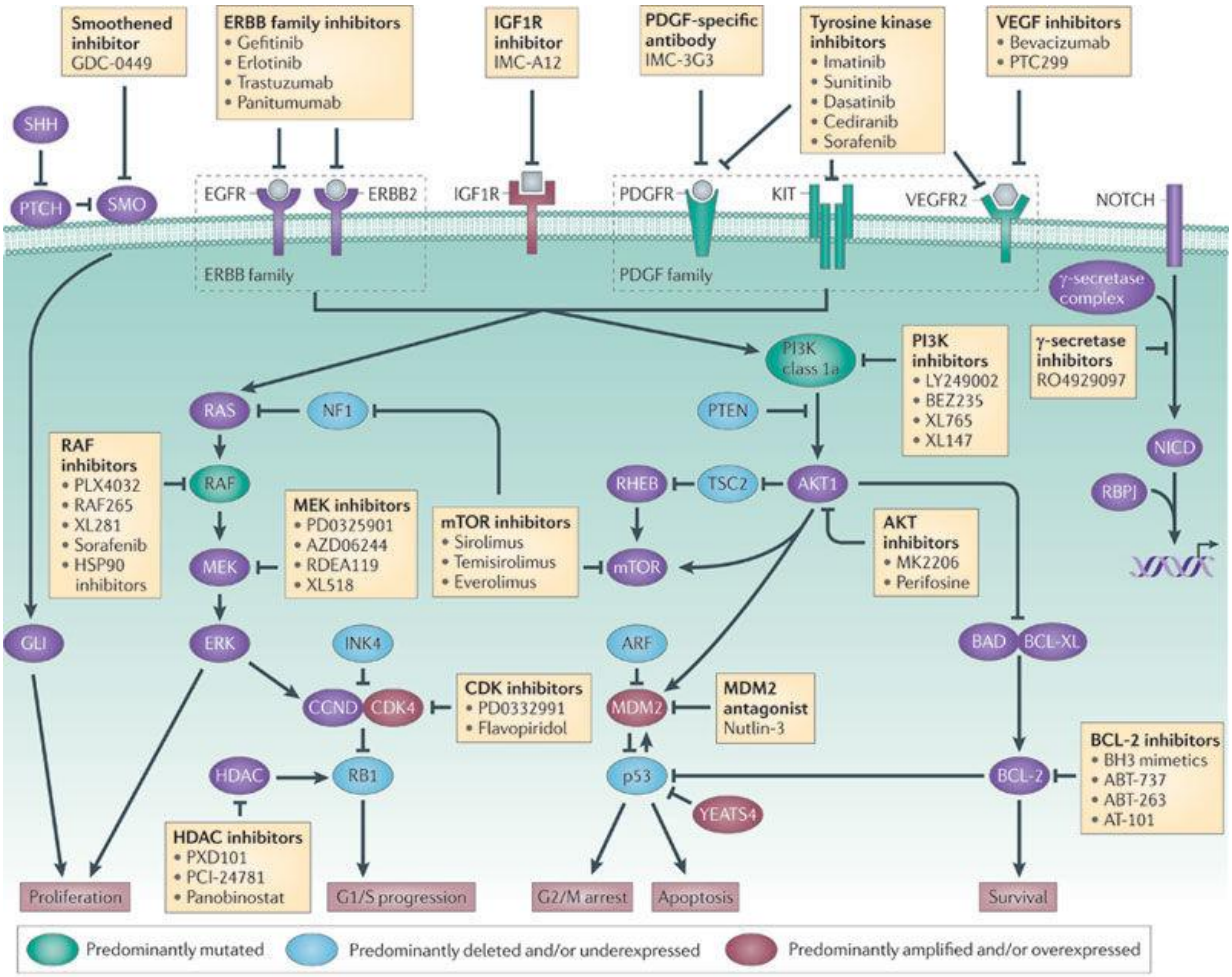


Figure 6 *Les voies de signalisation des facteurs de croissance convergent vers l'activation de PI3K/Akt et la voie des MAPK. Dans les sarcomes, PI3K/AKT et MAPK sont fréquemment hyperactivées, du fait de l'altération de l'expression (positive en rouge, négative en bleue) ou du fait de mutations (en vert) affectant leur interactome. Les agents thérapeutiques figurant sur ce schéma incluent ceux déjà utilisés en clinique, ceux en cours d'essai clinique ou encore ceux en développement pré-clinique. (extrait de Taylor et al, Nature Reviews Cancer, 2011)*

AKT exerce de nombreuses régulations, notamment l'activation de mTOR (inhibiteur de l'autophagie), de MDM2 (inhibiteur de p53) et l'inhibition de Bad (pro-apoptotique). Les

MAPK sont notamment impliquées dans la prolifération et le cycle cellulaire. En outre, Bad est également phosphorylée par ERK.

Dans les LPS myxoïdes, la voie PI3K/AKT est fréquemment hyperactivée du fait de mutations au niveau de la sous-unité p110α de la PI3K (18% des cas), mais également par la surexpression des récepteurs à domaine tyrosine kinase (RTK) tels que les proto-oncogènes MET, RET, les VEGFR, FRGF2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor* 2) et IGF-1R (conyers 2011).

IGF-1R active trois voies pro-survie majeures [58] : les voies PI3K/AKT et MAPK dont les actions sont présentées dans la **Figure 6**, mais également une signalisation calcique qui participe à la survie par l'activation de facteurs de transcription et la stimulation du métabolisme. Cet aspect de la chimiorésistance liée à la signalisation calcique est développé plus en détail dans la troisième partie de cette introduction.

Le récepteur possède différentes affinités pour les ligands (insuline, IGF1 et IGF2) selon les complexes dans lesquels il est engagé (**Figure 7**).

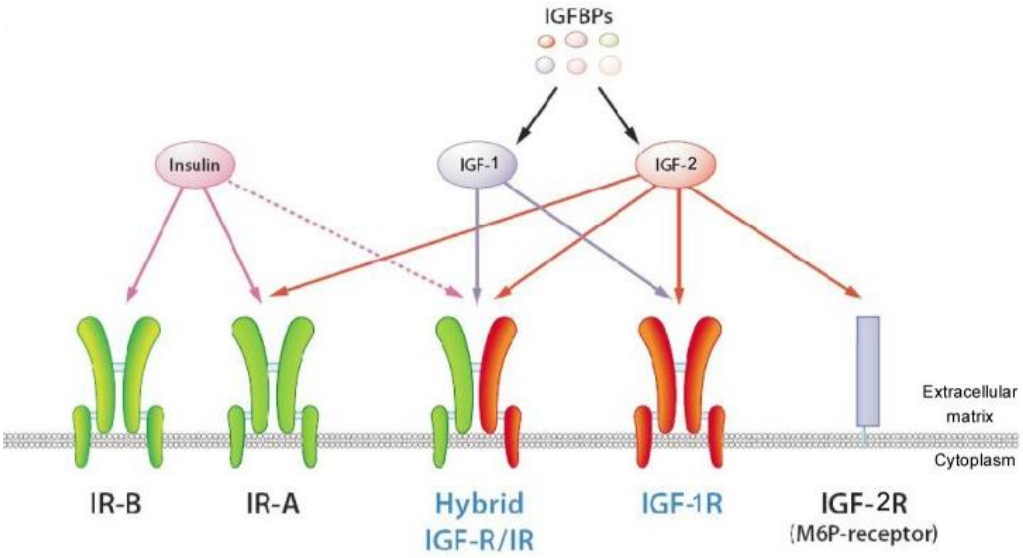


Figure 7 *La famille des récepteurs à l'insuline inclut deux isoformes du récepteur à l'insuline (IR-A et IR-B), le récepteur à l'IGF de type 1 (IGF-1R) et le récepteur IGF-2R. (extrait de Chen et al, Chin J Cancer, 2013)*

IGF-2R est un récepteur « leurre » pour IGF-2 et n'induit pas de signalisation. L'insuline lie préférentiellement les IR, mais peut être fixée par IGF-1R. Les dimères d'IGF-1R et les hybrides IGF-1R/IR lient préférentiellement IGF-1 par rapport à IGF-2. Les IGFBP (Insulin-like growth factor binding proteins) lient les ligands IGFs et préviennent l'activation des récepteurs.

IGF-1R est fréquemment surexprimé dans les STM par rapport au tissu sain [59] et est associé à une plus faible survie globale [60] et sans métastase [60,61]. Bien que la valeur pronostique d'IGF-1R dans les cancers fasse l'objet de controverses, l'activation de ses effecteurs en aval (PI3K/Akt et les MAPK) est associée à la rechute locale [62] et son implication dans la chimiorésistance est largement décrite dans de nombreux types de cancer . Dans les LPS, IGF-1R et ses ligands IGF-1 et IGF-2 sont surexprimés au niveau ARN par rapport au tissu adipeux [63,64]. Les gènes codant pour IGF-2 et IGF-1R font partie de régions fréquemment amplifiées dans les LPS [65]. Chez les patients atteints de STM, l'augmentation de l'expression d'IGFBP7 est associée au risque métastatique et les taux sériques d'IGFBP7 sont plus élevés en comparaison avec ceux d'individus en bonne santé, particulièrement chez les patients avec un sarcome synovial ou un LPS [66].

L'inhibition d'IGF-1R a soulevé beaucoup d'enthousiasme après des études précliniques très encourageantes, ce qui a motivé le développement d'anticorps ou de molécules ciblant les ligands, les protéines qui leur sont associées (les IGFBP, *IGF Binding Proteins*) ou le récepteur lui-même. Cependant, malgré une activité constatée dans certains modèles comme le sarcome d'Ewing, les résultats des essais cliniques ont été décevants et des résistances sont apparues [67].

La recherche de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité de la thérapie est donc indispensable. Parmi les candidats figurent les taux d'IGFs et d'IGFBP circulants, de même que l'hyperactivation des voies PI3k/Akt et des MAPK dans les tumeurs.

D'autre part, la fixation des ligands IGFs est réalisée soit par des homodimères d'IGF-1R, soit par des hybrides composés d'IGF-1R et du récepteur à l'insuline (IR). Un des mécanismes de résistance est donc certainement lié à la complexité des relations entre IR et IGF-1R, d'où l'importance des molécules comme le BMS-754807, qui inhibent les deux récepteurs.

Enfin, la redondance des voies de signalisation des facteurs de croissance permet de nombreux phénomènes de compensation. Ainsi, EGFR et IGF-1R sont connus pour compenser leurs déficiences de façon réciproque. De même, dans les rhabdomyosarcomes, la signalisation de FGFR4 protège de l'apoptose induite par le ciblage de la voie IGF-1R/PI3K/mTOR [68].

L'utilisation en agent seul d'un inhibiteur d'un récepteur comme IGF-1R est donc peu susceptible d'avoir des effets majeurs. La combinaison de l'inhibition de plusieurs voies et/ou avec des chimiothérapies « classiques » est donc la meilleure stratégie à employer. En effet, des

données précliniques montrent que l'inhibition de la tumorigenèse est plus efficace lorsqu'IGF-1R est inhibé après une chimiothérapie induisant les dommages à l'ADN [69,70]. De plus, dans les DDLPS, un screening de molécules a mis en évidence une synergie possible entre les inhibiteurs de CDK4 et d'IGF-1R [71].

3) Stratégies thérapeutiques en cours de développement

Les WDLPS et les DDLPS étant considérés comme résistants à la plupart des chimiothérapies actuelles, les recherches se focalisent sur les thérapies ciblant les altérations fréquentes dans ces tumeurs à savoir :

- **L'amplification de MDM2/CDK4**

L'amplification de MDM2 est commune aux WDLPS/DDLPS, mais celle de CDK4 est associée à un moins bon pronostic et aux DDLPS surtout, qui sont les plus agressifs. Ainsi, plusieurs inhibiteurs de MDM2 (comme les Nutlin) ou de CDK4 (comme le Flavopiridol) sont actuellement en phase d'essai clinique. *In vitro*, les Nutlins provoquent un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de l'apoptose *via* la restauration de l'activité de p53 [72]. Le Flavopiridol semble efficace en combinaison avec la doxorubicine (essai clinique de phase I) et n'augmente pas la toxicité par rapport à la doxorubicine seule [73].

- **La surexpression des récepteurs à tyrosine kinase**

Le pazopanib n'ayant aucun impact dans le traitement des LPS, les recherches se concentrent sur le sunitinib, qui inhibe un plus grand nombre de RTK. Une étude de phase I a montré que dans plusieurs types de tumeurs, lorsqu'il est associé à de la radiothérapie, il permettait une rémission complète ou partielle pour 59% des patients [74]. En 2013, un patient atteint d'un LPS avec des métastases pulmonaires a présenté une stabilisation de la maladie après un traitement au sunitinib précédé par de la radiothérapie [75]. Une étude de phase II est actuellement en cours pour évaluer l'impact du pazopanib après une première ligne de traitement avec l'imatinib et sunitinib pour les LPS métastatiques [76].

- **La dérégulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR**

Cette voie de signalisation est anormalement activée dans la plupart des sarcomes et conduit à une augmentation de la croissance cellulaire, de la survie, de la migration et de l'angiogenèse. Le principal inhibiteur testé est le ridaforolimus. Lors d'un essai de phase III en 2011, il n'a augmenté la survie que de 3 semaines[77]. Les cliniciens estiment que cette survie pourrait être augmentée en ciblant les tumeurs sensibles à cette molécule. Des études

complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre et identifier les facteurs prédictifs de la réponse à ce traitement.

- **Les agonistes de PPAR-γ**

Le but de l'utilisation de ces molécules dans le traitement des DDPLS est d'induire la différentiation adipocytaire afin de bloquer le cycle cellulaire des cellules tumorales et de diminuer leur agressivité. De plus, les agonistes de PPAR-γ réduiraient la signalisation d'IGF-1R [78].

Les différents essais cliniques n'ont pas été concluants, souvent à cause du faible nombre de LPS recrutés, mais également à cause du peu d'effet observé chez les patients. Actuellement, des molécules de troisième génération sont en cours d'essai pré-clinique afin de comprendre *in vitro* ce qui fait que l'impact diffère selon les molécules.

Les liposarcomes, et donc les DDLPS de surcroît, sont des tumeurs dont la rareté et l'hétérogénéité rendent difficiles le recrutement de patients pour les essais cliniques ainsi que les études génétiques à grande échelle comme cela a pu être fait dans le cas des cancers du sein, du poumon ou du colon.

D'autre part, la classification des STM est constamment réévaluée et remise à jour, grâce au développement de la cytogénétique et à l'identification de marqueurs complétant l'analyse anatomopathologique pour affiner le diagnostic.

Certaines altérations récurrentes ont permis d'introduire dans la pratique médicale des thérapies ciblées, comme l'imatinib dans le traitement des GISTs. De nombreuses molécules sont en cours de développement, afin de mettre en place des thérapies plus ciblées et plus personnalisées. Toutefois, ceci ne pourra être réalisable que si les essais cliniques intègrent l'identification de biomarqueurs pouvant être prédictifs de la réponse au traitement. Sinon, le risque serait, comme pour l'inhibition de la signalisation d'IGF-1, d'obtenir une efficacité minime ou nulle, due aux nombreux mécanismes de résistance existants.

A l'heure actuelle, les traitements classiques utilisés dans le traitement des STM ou en cours de développement ne font pas preuve d'une efficacité satisfaisante sur les DDLPS. La chirurgie demeure l'acte de soin principal, mais n'octroie au patient qu'un sursis car la rechute est systématique, et dans le cas des tumeurs non résécables ou métastatiques, la chimiothérapie n'est que palliative. Améliorer la chimiosensibilité de ces tumeurs est donc le défi majeur à relever pour les années à venir.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux médiateurs possibles de la sensibilisation des DDLPS au traitement, et notamment au rôle potentiel de la protéine de longévité Klotho, qui est essentielle à l'homéostasie du tissu adipeux. Klotho est décrite comme un inhibiteur universel de la voie IGF-1R, mais également comme un suppresseur de tumeur aux multiples effets car elle régule de nombreuses voies impliquées dans l'oncogenèse et la progression tumorale.

Chapitre 2 : Klotho, un gène de longévité au service de la lutte contre le cancer

Le gène *klotho* fut découvert de façon fortuite en 1997 par Kuro-o *et al*, qui étudièrent des souris dans lesquelles l'insertion d'un transgène exogène avait entraîné dès 3-4 semaines un retard de croissance, l'apparition de nombreux troubles ressemblant à un vieillissement prématuré (infertilité, artériosclérose, atrophie de la peau, ostéoporose), puis une mort précoce à 8-9 semaines [79]. A ces symptômes étaient associés une hyperphosphatémie, une hypercalcémie et une hypoglycémie (taux sériques de phosphates, calcium et glucose, respectivement), ainsi qu'un défaut de production de GH (*Growth Hormone*, hormone hypophysaire) et une atrophie des glandes génitales, de la peau et du thymus. Le gène muté responsable de ce phénotype fut identifié et baptisé *klotho*, du nom de l'une des trois divinités grecques du Destin qui tisse le fil de la vie.

Du fait de son rôle dans la longévité, Klotho a été particulièrement étudiée dans le contexte du vieillissement et des pathologies liées à l'âge (maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, insuffisance rénale,…). Son action est décrite dans presque tous les organes du corps et met en œuvre différents mécanismes selon les cibles, parmi lesquelles beaucoup sont dérégulées dans les cancers. Le rôle de Klotho vis-à-vis de voies de signalisation et processus cellulaires majeurs n'a pas tardé à susciter l'intérêt des chercheurs en cancérologie après sa découverte.

Le but de cette partie est donc, dans un premier temps, de faire l'état des connaissances concernant les actions moléculaires et physiologiques de Klotho dans l'organisme. Cet aspect est d'autant plus important que depuis un certain nombre d'années déjà, l'interconnexion des voies impliquées dans le vieillissement et l'oncogenèse a fait l'objet de nombreux travaux.

En effet, bien que les caractéristiques de la cellule vieillissante et celles de la cellule cancéreuse soient en de nombreux points opposées, elles reposent sur des voies communes [80–82]. Au cours du vieillissement, on assiste à un dysfonctionnement des cellules souches, une reprogrammation métabolique et à l'augmentation de ROS (espèces réactives de l'oxygène) [83]. Les mutations s'accumulent dans la cellule à cause de l'instabilité génétique. Certaines d'entre elles permettent un échappement de la cellule à la sénescence et à la mort, il s'agit d'une des origines supposées du cancer. Enfin, le sécrétome de la cellule en sénescence participe à la

création d'un micro-environnement favorable à l'initiation et à la progression des tumeurs, notamment par le biais de l'inflammation [84].

Dans un second temps seront donc développées les propriétés de suppresseur de tumeur de Klotho, une caractéristique qu'elle partage avec de nombreux acteurs de la longévité [85], mais aussi certains résultats conflictuels qui suggèrent un rôle ambivalent vis-à-vis du cancer selon le contexte cellulaire. L'aperçu des mécanismes par lesquels elle prolonge l'espérance de vie et protège les organes des dommages est donc nécessaire pour appréhender son rôle dans les cancers.

I. Expression et régulation de *Klotho*

1) Du gène de longévité à la protéine sécrétée

Le gène humain *KL* se situe sur le bras long (q) du chromosome 13 en position q12. *KL* est constitué de 5 exons qui codent pour la protéine αKlotho (αKL ou KL) de 135kDa qui est identique à 86% à la protéine murine [79] et dont la séquence de 1012 acides aminés est composée des domaines suivants (**Figure 8**) :

- une séquence signal d'adressage à la membrane plasmique en N-terminus (SS)
- deux répétitions KL1 et KL2 avec homologie de séquence avec la βglucosidase mais dont il manque les résidus essentiels à l'activité enzymatique de type glucosidase
- un « linker » (L) possédant un site de clivage protéolytique Lys-Lys-Arg-Lys [86]
- un domaine transmembranaire (TM)
- un court domaine cytoplasmique en C-terminus (CD).

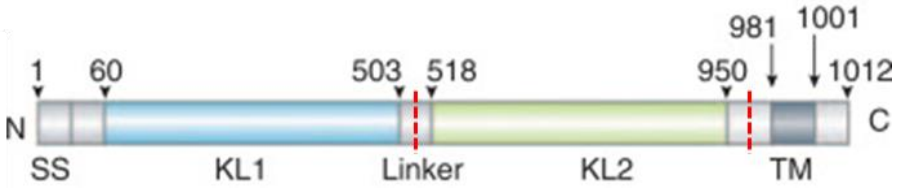


Figure 8 *Structure et zones de clivage (en pointillés rouges) de la protéine humaine Klotho (extrait de Huang, Kidney International, 2010)*

Ancrée à la membrane, Klotho peut être clivée à la surface des cellules par des métalloprotéases (ADAM10 et ADAM17) [87] ou des sécrétases entre les domaines KL1 et KL2 ou entre KL2 et le domaine transmembranaire [88].

Le clivage entre KL1 et KL2 est dépendant de la région juxta-membranaire [89] et génère ainsi directement dans le milieu extracellulaire des fragments solubles contenant soit KL1 (60-70kDa), soit KL2, soit KL1 et KL2 (130kDa).

Un autre processus permet la production de la forme soluble de KL [86,90] : un épissage alternatif du transcrit aboutit à une forme tronquée de la protéine, dépourvue de la partie C-terminale contenant KL2, et dont les 15 derniers acides aminés diffèrent de ceux de la protéine membranaire. Le résultat de cet épissage est donc une protéine soluble (KLs) d'environ 70kDa qui sera directement sécrétée dans le sang, le liquide cérébrospinal et les urines, agissant ainsi dans l'ensemble de l'organisme à la façon d'une hormone. Chez l'homme, à l'inverse de la souris, la forme sécrétée de Klotho prédomine par rapport à la forme membranaire [86]. Tous ces différents mécanismes sont résumés dans la **Figure 9**.

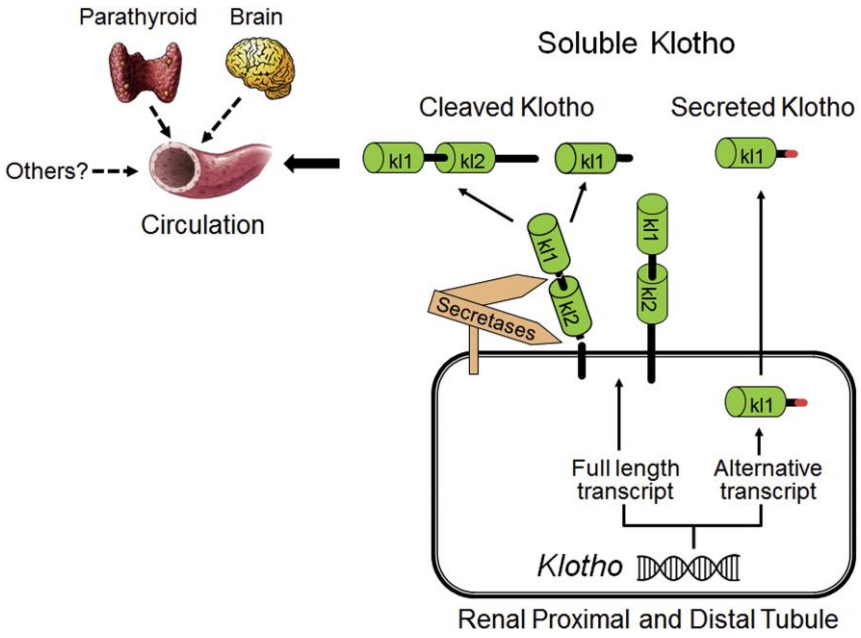


Figure 9 *Différents mécanismes de la production de Klotho soluble : par clivage et épissage alternatif (d'après Neyra et al, Bone, 2017)*

Au niveau cellulaire, plusieurs localisations de Klotho ont été décrites : à la membrane plasmique, dans le cytosol, mais également dans des fractions du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi et des endosomes précoces [91]. Enfin, une localisation nucléaire a également été décrite dans les cellules des plexus choroïdes et de Purkinje [92].

La famille de Klotho comprend deux autres membres : βKlotho, dont le gène *KLB* est au locus 4p14, et γKlotho, codée par le gène *LCTL* situé en 15q22. βKlotho est co-récepteur de FGF21 [93] et FGF19 [94], mais la fonction de γKlotho demeure inconnue. En effet, ces deux paralogues sont bien moins étudiés et donc moins connus qu'αKlotho.

2) Régulation physiologique de l'expression de *KL*

Yamazaki *et al.* ont constaté sur des individus en bonne santé que la concentration sérique de KLs diminuait en fonction de l'âge [95], avec une corrélation négative statistiquement significative, renforçant ainsi le lien entre la réduction de l'expression de *KL* et le vieillissement chez l'homme. Outre la régulation temporelle de son expression, certains facteurs influencent l'expression de *KL* : ils sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 *Eléments régulateurs de l'expression du gène KL*

Régulation positive de *KL*	
SP1 [96,97]	Facteur de transcription inhibé par l'Angiotensine II
EGR-1 [98]	Facteur de transcription activé par EGH dans les cellules HEK293
Pax4 [99]	Facteur de transcription lié au promoteur de *KL* après utilisation d'un composé déméthylant des îlots CpG
Calcitriol (forme active de la vitamine D) [100]	Utilisation d'agonistes du récepteur de la vit. D (calcitriol et paricalcitol) sur des modèles murins de maladie rénale chronique
Sirtuin 1 [101]	Génération de souris transgéniques avec une surexpression de Sirt1 dans le tissu cardiaque
Enpp1 [102]	Chez des souris en surdosage alimentaire de phosphates
Erythropoïétine (EPO) [103]	Utilisation d'EPO recombinante humaine dans un rat modèle pour la néphropathie chronique
PPARγ [104]	Utilisation du rosiglitazone, l'agoniste de PPARγ, pour restaurer l'expression dans le cerveau de rats atteints de diabète de type I
Exercice physique [105,106]	L'activité physique augmente la concentration sérique de KLs
Oestradiol [107]	Utilisation d'oestradiol sur des souris KO ERβ
Testostérone [108]	Dans les cellules rénales, *in vitro* et *in vivo*
Resveratrol [109]	Activation du complexe ATF3/c-Jun qui lie le promoteur de *kl* dans des cellules NRK-52E
Régulation négative de *KL*	
FGF23 [110]	Souris transgéniques exprimant le FGF23 humain
Kid3 [99]	Facteur de transcription lié au promoteur de *KL* après utilisation d'un composé déméthylant des îlots CpG
Angiotensine II [111]	Utilisation du losartan, agent bloquant du récepteur AT1
TGFβ1 [112]	Démonstration *in vitro* avec une lignée de cellule de tubule rénal proximal
TNFα et TWEAK [113]	Dans la lignée cellulaire de tubule rénal MCT, *via* la fixation de RelA sur le promoteur de *KL*
miRNAs	miR-199b-5p [114] : souris modèles pour la néphropathie diabétique traitées avec l'atrasentan, qui inhibe miR-199b-5p er restaure l'expression de *KL*

De plus, le gène *KL* est exprimé de façon différente selon les tissus [115,116] (**Figure 10**) : de façon particulièrement importante dans le tubule contourné distal rénal, impliqué dans la réabsorption du phosphate urinaire, dans les plexus choroïdes du cerveau, qui produisent le liquide cérébrospinal, dans les glandes parathyroïdes, l'hypophyse et le nœud sinusal du cœur. Dans une moindre mesure, le gène *KL* est également exprimé dans le tubule proximal rénal, le placenta et les organes sexuels (ovaires, testicules). Bien qu'en comparaison son expression y soit plus faible, elle est également détectée dans de nombreux autres tissus tels que le colon, le muscle squelettique, le sein, le pancréas, l'adventice de l'aorte, le tissu adipeux… dans lesquels une altération de son expression ou du gène est associée à des désordres ou des pathologies. Toutefois, l'expression de *KL* dans certains tissus fait encore débat en raison de résultats contradictoires, comme le foie par exemple [115].

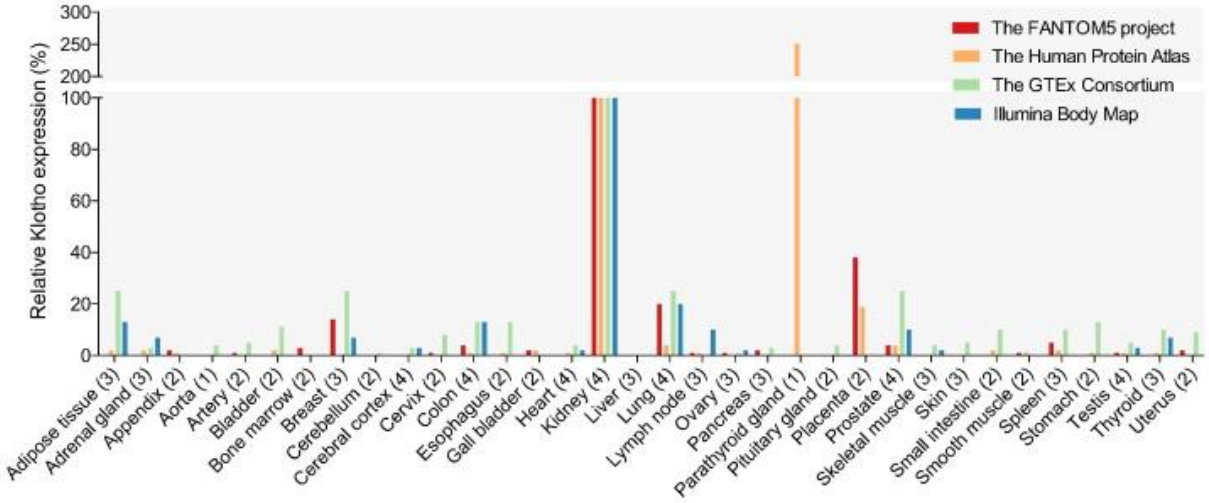


Figure 10 *Expression de KL par RNAseq dans les tissus humains, fournie par quatre bases de données. Les valeurs ont été normalisées par rapport au rein ramené à 100% (extrait de Olauson et al, Bone, 2017)*

3) Variants du gène *KL* et altération de son expression : des anomalies physiologiques aux pathologies cancéreuses.

a) Impact des variants génétiques sur la physiologie

L'étude clinique des variants génétiques du gène *KL* a permis d'appréhender le rôle de Klotho chez l'humain.

En 2007, Ichikawa *et al* [117] rapportent le cas d'une jeune fille de 13 ans atteinte d'une sévère calcinose tumorale, caractérisée par des dépôts calciques dans les tissus mous extra-articulaires et notamment les vaisseaux sanguins. Ces dépôts sont associés à une

hyperphosphatémie, une hypercalcémie et des taux sériques élevés d'hormone parathryroïdienne (PTH) et de FGF23. La patiente présentait une mutation homozygote faux-sens H193R affectant le domaine KL1 qui entraînait une altération de la stabilité de la protéine, résultant en une réduction de son expression et de sa maturation. Ce cas clinique apportait donc la preuve du rôle systémique de Klotho chez l'homme dans le métabolisme des phosphates, du calcium et dans la signalisation FGF23, de façon similaire à ce qui avait été décrit dans les modèles murins mutés pour ce gène.

Cependant, si la déficience en Klotho est délétère chez l'humain de façon similaire aux modèles murins *kl-/-*, une surproduction de la protéine cause également des déséquilibres. Cet aspect est illustré par le cas d'une patiente présentant, dès 13 mois, un rachitisme associé à une hypophosphatémie et un taux sanguin de PTH élevé [118]. A 7 ans, le taux de PTH élevé avait entraîné une hypercalcémie et elle fut opérée pour une hyperplasie parathyroïdienne, qui dut être répétée à l'âge de 19 ans. Il s'est avéré que la patiente avait une translocation entre les chromosomes 9 et 13 à proximité du gène *KL*. Les analyses de sang ont révélé que la forme circulante de Klotho était beaucoup plus abondante et qu'en conséquence, son activité glucuronidase était augmentée par rapport aux individus de même âge et de même genre. En conclusion, l'utilisation thérapeutique de Klotho chez l'humain peut être envisagée dans le cas de déficiences mais une surabondance de la forme sécrétée perturberait les régulations fines et complexes qui concourent à l'équilibre physiologique.

D'autres SNPs (*Singles Nucleotide Polymorphisms*) dans le gène humain *KL* ont été rapportés, leur localisation dans le gène est présentée dans la **Figure 11**.

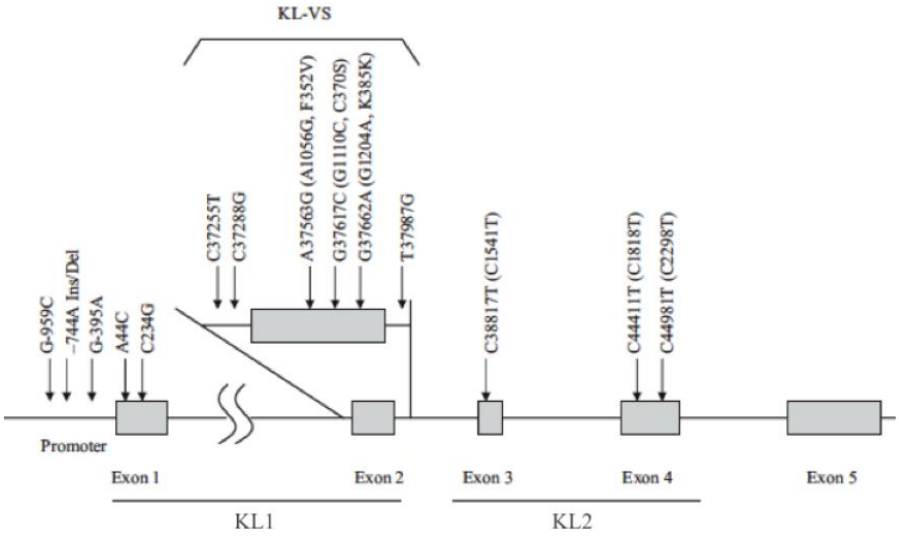


Figure 11 *Localisation des différents SNPs répertoriés dans le gène KL (extrait de Shimoyama et al, Am J Nephrol, 2009)*

Le polymorphisme G395A dans la région du promoteur serait associé au risque de développement de cancer colorectal [119], aux maladies coronariennes [120] et à la survenue de calculs rénaux [121]. Ceci serait dû à une altération des interactions ADN-protéine aboutissant à une diminution de l'expression de *KL* [122].

Certains polymorphismes des régions non-codantes ont été associés à des maladies [123–125] mais du fait de leur fréquence très faible, ils sont très peu étudiés. De même, les SNPs affectant le domaine KL2 ont été reliés aux désordres métaboliques [126], aux maladies cardio-vasculaires [127] et aux calculs rénaux [128], mais étant donné que ce domaine n'est pas conservé lors de l'épissage alternatif, l'étude de son rôle dans la fonction de la protéine a été négligée.

En revanche, il existe un variant fonctionnel KL-VS bien plus étudié car présent chez 20-25% de la population [129], qui contient 6 SNPs toujours associés dont :

- Trois sont localisés dans des introns et n'altèrent pas l'épissage alternatif
- Une substitution silencieuse au nucléotide 1155
- deux substitutions dans le domaine KL1 : F352V (très conservé dans plusieurs espèces) ainsi que C370S, qui entraînent une altération des interactions et de la sécrétion de la protéine [130].

Les porteurs hétérozygotes de ce polymorphisme auraient une longévité [129] et une cognition améliorées du fait d'une sécrétion plus importante de la forme soluble de la protéine [131], tandis que les individus homozygotes auraient un risque accru de désordres métaboliques et de maladies cardiovasculaires, soulignant ainsi l'impact de son degré d'expression sur l'équilibre physiologique. Dans le cas des hommes âgés (71-87 ans), ce polymorphisme serait associé à un risque accru de démence, en particulier pour les individus homozygotes [132]. Ceci illustre également l'importance du contexte physiologique dans lequel elle agit. Certains auteurs ont également suggéré qu'il s'agirait d'un facteur prédictif de risque de cancer mammaire pour les patientes porteuses de la mutation de BRCA1, à condition d'être validé dans une cohorte plus grande [133]. Toutefois, cette association n'a pas été retrouvée dans l'étude qui a suivi [134]. Les différentes études, parfois contradictoires, concernant les individus homozygotes ou hétérozygotes porteurs de ce variant sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 *Résumé des publications concernant les individus homozygotes (Hom) ou hétérozygotes (Het) pour le polymorphisme KL-VS*

Pathologie	Association	Pas d'association
Maladie métabolique	• Population Indienne **(Hom)** (Majumdar et Christopher, 2011)	• Diabète dans la population caucasienne en Grande Bretagne **(Het et Hom)** (Freathy *et al.,* 2006)
Cancer	• Cancers du sein et des ovaires positifs pour BRCA1 et 2 **(Het)** (Wolf *et al.*, 2009)	• Cancers du sein et des ovaires positifs pour BRCA1 et 2 **(Het)** (Laitman *et al.,* 2012)
Maladie cognitive	• Diminution de la cognition pour les personnes de 92-100ans **(Het)** (Mengel-From *et al*., 2016) • Amélioration de la cognition **(Het)** (Yokoyama *et al*, 2015)	
Densité minérale osseuse	• Augmentation de la densité osseuse chez les jeunes hommes **(Het)** (Zarrabeitia *et al*., 2007) • Taux élevé de la densité minérale osseuse chez les femmes ménopausées **(Het)** (Riancho *et al.*, 2007)	
Maladie cardiovasculaire	• Augmentation des cas précoces **(Het et Hom)** (Arking *et al.*, 2003) • HDL, pression sanguine et AVC **(↗Het et ↘Hom)** (Arking *et al.,* 2005) • AVC ischémique précoce **(Hom)** (Majumdar *et al.,* 20010) • Régulation de la pression sanguine **(Hom)** (Nzietchueng *et al.,* 2011)	• AVC prématuré **(Het et Hom)** (Low *et al*., 2005) • Calcification valvulaire et vasculaire **(Het et Hom)** (Tangri *et al*., 2011) • Taux de nitrites et de nitrates plasmatiques **(Het et Hom)** (Majumdar *et al*., 2011)

b) Les mutations et régulations épigénétiques de *KL* dans les cancers

La base de données cBioPortal sur la génomique des cancers (http://www.cbioportal.org/) rapporte que les cancers les plus fréquemment mutés pour *KL* sont les mélanomes, avec une très large majorité de mutations faux-sens, ainsi que les cancers de la prostate qui présentent principalement des délétions. Dans cette même base, bien que le chromosome 13 soit fréquemment altéré dans les STM (notamment par des délétions affectant le gène suppresseur de tumeur *RB1*), la cohorte de 248 STM ne comporte que deux amplifications, cinq délétions et une mutation faux-sens de *KL*.

Toutefois, la littérature rapporte essentiellement une sous-expression de *KL* dans les tissus tumoraux par rapport au tissu sain adjacent dans de nombreux carcinomes : mammaires [134], gastriques [135,136], pancréatique [137], hépatocellulaire [135], entre autres, mais également dans les mélanomes [138]. Cette perte d'expression serait due à des régulations épigénétiques

(hyperméthylation du promoteur [135,139–143] et désacétylation des histones [140,142,144]), ou encore à des miRNA tels que l'oncogène miR-199-a-5p dans le cancer gastrique [145], miR-504 dans l'adénocarcinome ductal pancréatique[143] ou les miR-339 et miR-556 qui sont capables de réguler l'expression de *KL in vitro*. La signifiance clinique de ces derniers reste à démontrer, bien que miR-556 soit détecté dans les cellules cancéreuses (cancer colorectal, cervical et mélanome) mais soit absent des cellules saines [146].

II. Fonctions systémiques et cellulaires de Klotho

Certaines fonctions de Klotho peuvent être remplies par chacune de ses formes, soluble ou membranaire, tandis que certaines sont exclusives. Ainsi, Klotho ancrée à la membrane sert de co-récepteur, tandis que son activité enzymatique serait partagée par les formes membranaire et sécrétée. A l'heure actuelle, aucun récepteur pour la forme soluble de Klotho n'a pu être identifié, mais du fait des nombreuses interactions qu'elle engage ainsi que sa présence dans le sang et le liquide cérébrospinal, ses effets sont variés et concernent l'ensemble des organes.

1) Klotho est essentielle à l'homéostasie minérale de l'organisme

a) Régulation de la phosphatémie par Klotho

La régulation de la phosphatémie (concentration de phosphates dans le sang) est un processus physiologique majeur car :

- 85% des phosphates participent à la composition de l'os, faisant de ce tissu la principale réserve de phosphates de l'organisme
- les phosphates inorganiques participent à l'équilibre acido-basique et à l'électroneutralité cellulaire en liant d'autres ions (calcium, magnésium, potassium…)
- les phosphates organiques entrent dans la composition de l'ADN, des métabolites (l'ATP et ses dérivés), des phospholipides et des protéines.

Le phosphate est impliqué dans tous les mécanismes biologiques clés, tels que la prolifération et la croissance cellulaire, et sa régulation est capitale dans le contrôle de la longévité. En effet, dans le règne animal, la phosphatémie est négativement corrélée à la durée de vie : chez les rongeurs elle est très élevée tandis que les taux sériques les plus faibles sont retrouvés chez l'homme, l'éléphant et le rhinocéros.

Trois organes principaux sont impliqués dans la régulation des phosphates :

- **les os**, qui servent de réserve et dont les ostéocytes produisent l'hormone FGF23 (*Fibroblast Growth Factor 23*) qui réduit la concentration sérique en phosphates
- **l'intestin**, dont le duodénum et le jéjunum sont impliqués dans l'absorption des phosphates issus de l'alimentation, stimulée par le calcitriol (la forme active de la vitamine D), *via* le transporteur intestinal NaPi-IIb.
- **les reins**, qui régulent de façon continue la balance entre l'excrétion et la réabsorption (par le tubule proximal) des phosphates et produisent le calcitriol, qui stimule l'absorption intestinale et la réabsorption rénale de phosphates, ainsi que la production de FGF23 par les ostéocytes
- **les glandes parathyroïdes**, qui produisent la parathormone (PTH) stimulant la résorption osseuse, et donc la libération de phosphates et de calcium, tout en réduisant la réabsorption rénale de phosphates afin de limiter le risque de précipitation des ions calciques et phosphates dans le sang. La PTH favorise également la production de calcitriol par l'enzyme rénale 1α-hydroxylase (CYP27B1).

Dans les souris *kl-/-*, modèles animaux pour le vieillissement, une hyperphosphatémie associée à une hypercalcémie est observée. Un régime pauvre en phosphore, sur des souris homozygotes pour une mutation qui réduit considérablement l'expression de *kl*, ré-augmente leur durée de vie et réduit la calcification des tissus *via* une restauration de l'expression de *kl* dans le rein [147]. De même, les souris *fgf23-/-* récapitulent de nombreux phénotypes présents dans les souris *kl-/-* parmi lesquels la calcification ectopique des tissus mous, le retard de croissance et l'espérance de vie réduite [148]. L'ablation de l'expression du récepteur de la vitamine D ou de l'enzyme 1α-hydroxylase restaure les phénotypes de souris respectivement KO pour *fgf-23* [149] et *kl* [150]. Il a par ailleurs été démontré dans des modèles murins que les effets de FGF23 sur la phosphatémie nécessitaient l'expression de *kl* [151].

Il s'avère que la glycoprotéine membranaire Klotho forme un complexe avec divers récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes : FGFR1c, FGFR3c et FGFR4, et augmente ainsi leur affinité pour FGF23 [152]. En tant que de co-récepteur obligatoire pour FGF23, l'expression de Klotho détermine donc l'action tissu-spécifique de FGF23 (**Figure 12**).

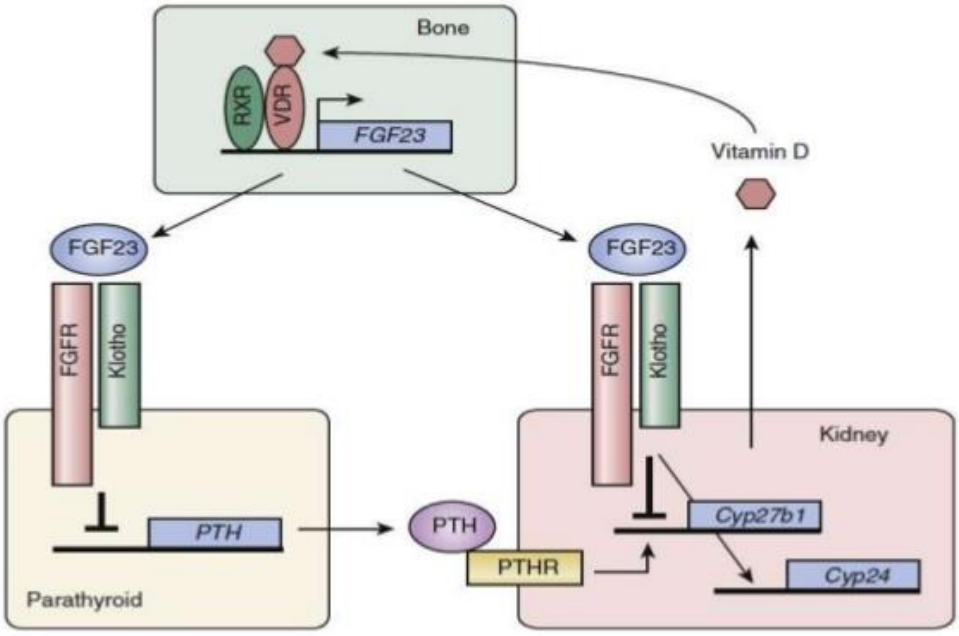


Figure 12 *Régulation de la phosphatémie par la signalisation Klotho-FGF23 et le dialogue hormonal entre les différents tissus (extrait de Kuro-o, Biochim Biophys Acta., 2009)*

En permettant la liaison de FGF23 à son récepteur au niveau des reins, Klotho réduit la réabsorption de phosphates par le tubule proximal en inhibant les transporteurs impliqués (NaPi-IIa et NaPi-IIc), ainsi que l'expression de l'1α-hydroxylase qui produit le calcitriol. Dans les glandes parathyroïdes, l'action de la voie de FGF23 régule l'expression et la sécrétion de la PTH, tout ceci résultant en une baisse des phosphates sériques.

Outre l'effet FGF-23-dépendant de Klotho sur l'expression des transporteurs rénaux des phosphates NaPi-IIa et NaPi-IIc et sur le transporteur intestinal NaPi-IIb [153], la forme circulante de Klotho peut également réguler l'activité de NaPi-IIa par son activité déglycosylante, dont il reste à déterminer si elle est directe ou fait intervenir une protéine régulatrice [154] (**Figure 13**).

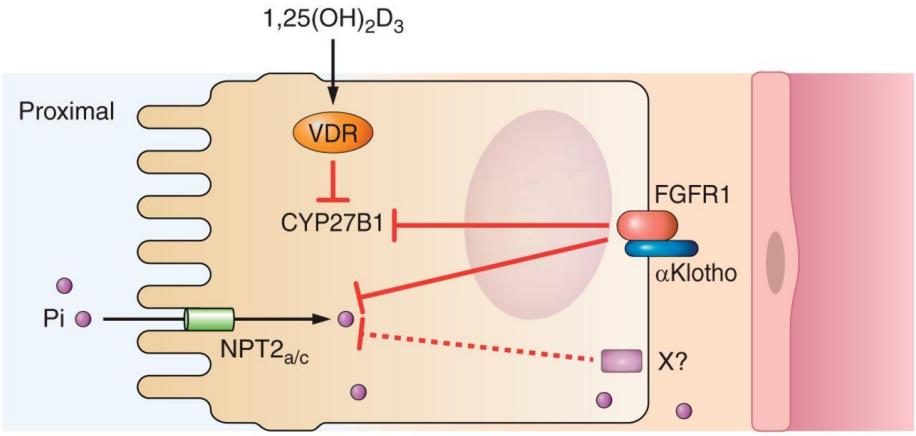


Figure 13 *Dans le tubule rénal proximal, la réabsorption des phosphates est réduite d'une part via l'inhibition de l'expression de CYP27B1 (codant pour l'1α-hydroxylase) et des transporteurs NaPi-IIa et c (=NPT2a/c) par l'activation du complexe FGF23/FGFR1/Klotho, et d'autre part via l'action directe de Klotho sur NaPi-IIa. (extrait de Christakos et al, Physiological Reviews, 2016)*

La forme membranaire de Klotho agit donc dans plusieurs organes afin de réguler la phosphatémie. Mais elle permet également le maintien d'un autre paramètre sanguin très important : la calcémie. En effet, le risque majeur d'une augmentation des phosphates et des ions calcium dans le sang est leur précipitation.

b) Régulation de la calcémie et des canaux ioniques

L'activité enzymatique β-glucuronidase de Klotho, bien que prouvée vis-à-vis des stéroïdes glucuronidés [155], est encore peu connue et son importance au niveau biologique reste à démontrer. En revanche, il a été mis en évidence qu'elle possédait une activité sialidase dont les cibles ne se limitent pas aux transporteurs des phosphates. En effet, elle modifie les N-glycanes matures des glycoprotéines et glycolipides, régulant ainsi l'activité et la localisation de canaux ioniques [156].

Les souris *kl-/-* présentent, associée à l'hyperphosphatémie, une hypercalcémie entraînant notamment la calcification des tissus mous. L'élévation du calcium (Ca^{2+}) sérique serait notamment due à l'élévation de la vitamine D [150,157]. De plus, l'excrétion rénale de Ca^{2+} est augmentée dans ces souris, indépendamment de l'hypercalcémie et de l'hypervitaminose D [158].

La réabsorption des ions Ca^{2+} dans le tubule contourné distal fait intervenir un acteur clé : le canal calcique TRPV5 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 5*).

Outre la voie FGF23 qui est un régulateur de l'expression et du transport de TRPV5 [159], Klotho est capable de moduler directement TRPV5 (**Figure 14**). En effet, le site N-glycosylé N358 de TRPV5 est ciblé par Klotho [160] et sa dé-glycosylation stabilise TRPV5 à la membrane plasmique, augmentant ainsi la réabsorption de Ca^{2+}. Il en est de même pour un autre canal calcique, TRPV6 [161] qui est impliqué dans l'absorption de Ca^{2+} par l'intestin. Cette action peut être réalisée par les formes solubles et membranaires de Klotho. Toutefois, il a été démontré que la forme membranaire avait également une action intracellulaire N-déglycosylante sur TRPV5, augmentant ainsi son trafic en plus de l'inhibition de son endocytose par son action extracellulaire [162].

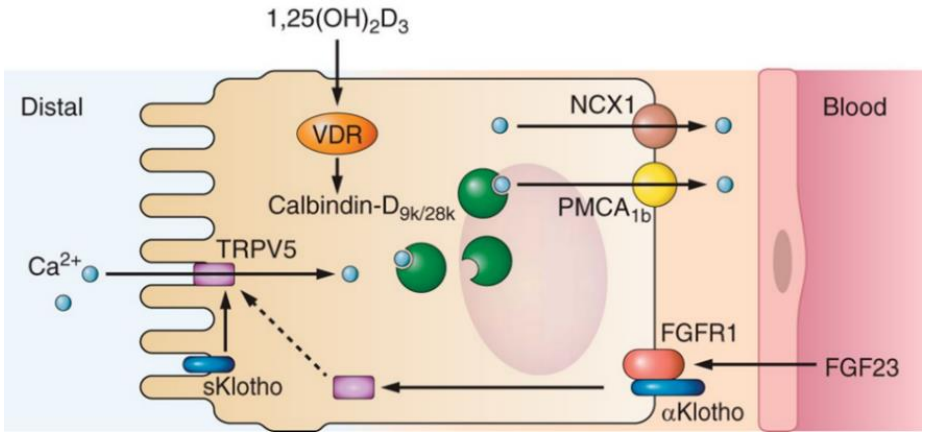


Figure 14 *Dans le tubule contourné distal, la réabsorption de Ca^{2+} est stimulée par le calcitriol et l'augmentation de la présence de canaux TRPV5 à la membrane apicale via l'activation du complexe FGF23/FGFR1/Klotho d'une part, et la déglycosylation de TRPV5 par Klotho d'autre part. L'extrusion du Ca^{2+} est assurée par les pompes PMCA et NCX1 à la membrane basolatérale. (extrait de Christakos et al, Physiological Reviews, 2016)*

De façon similaire, Klotho ôte les acides sialiques des N-glycanes du canal potassique rénal ROMK1 (*Renal Outer Medullary Potassium channel 1*), permettant ainsi sa liaison avec la protéine galectin-1, qui empêche son endocytose [163]. De façon similaire à TRPV5, Klotho stabilise ROMK à la membrane et augmente donc l'excrétion de potassium, participant au maintien de la différence de potentiel nécessaire à la réabsorption du Ca^{2+} [164].

La force iono-motrice permettant le transport rénal trans-épithélial de Ca^{2+} provient également de la pompe Na^+/K^+-ATPase. Klotho interagit avec elle dans les fractions des endosomes précoces, de l'appareil de Golgi et du RE et stimule son abondance et son activité à la membrane [91].

Il a également été décrit dans une lignée de cellules β d'insulinome que Klotho favorisait la présence du canal TRPV2 à la membrane plasmique, augmentant ainsi la sécrétion d'insuline

suite à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire induite par le glucose [165]. Toutefois il s'agit du seul travail rapportant un effet de Klotho sur TRPV2, d'autres études seront donc nécessaires afin de vérifier sa pertinence au niveau physiologique et de déterminer si les mécanismes sont les mêmes que pour TRPV5 et TRPV6.

En revanche, il a été montré qu'au niveau de l'endothélium vasculaire Klotho favorise l'internalisation du complexe TRPC1 (*Transient Receptor Potential Canonical 1*)-VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth factor Receptor 2*) [166]. Ainsi, Klotho empêche l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par le VEGF, qui provoque l'apoptose et l'hyperperméabilité de l'endothélium constatée dans les souris *kl-/-*. Cette fonction est assurée par le domaine KL2, qui interagit à la fois avec VEGFR2 et TRPC1.

Enfin, Klotho a une action inhibitrice sur le canal calcique TRPC6, impliqué dans la fibrose rénale [167]. Le mécanisme est le suivant : Klotho interagit avec les α2-3-sialyllactoses des gangliosides, des glycolipides enrichis au niveau des radeaux lipidiques, et empêche l'exocytose de TRPC6, induite par les facteurs de croissance tels qu'IGF-1, *via* l'inhibition de la PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*) [168]. En effet, les radeaux lipidiques sont des microdomaines qui servent de plateformes pour des récepteurs et des canaux, et qui permettent de recruter des effecteurs intracellulaires pour la transduction des signaux. KL1 et non KL2 serait responsable de l'interaction avec les α2-3-sialyllactoses [169].

En conclusion, Klotho a un rôle physiologique essentiel par la régulation de la phosphatémie et la calcémie. Ce maintien de l'homéostasie fait intervenir les formes membranaires et/ou solubles et requiert soit des interactions avec des partenaires, soit son activité sialidase. Mais son action ne se limite pas à l'homéostasie minérale de l'organisme. En effet, elle favorise aussi la longévité en inhibant la signalisation de certains facteurs de croissance.

2) Klotho inhibe la signalisation de récepteurs impliqués dans l'espérance de vie et les processus oncogéniques

a) Klotho inhibe l'axe de signalisation insuline/IGF-1

Le lien entre Klotho et la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) fut établi dès l'observation des modèles murins déficients ou surexprimant *kl* :

- Les souris *kl-/-* présentent une hypoinsulinémie associée à une hypoglycémie ainsi qu'à une sensibilité extrême à l'insuline [79,170]

- Les souris surexprimant *kl*, en revanche, sont résistantes à l'insuline malgré une glycémie normale et aucun développement de diabète [171]
- Réciproquement, les souris *kl-/-* hétérozygotes pour une mutation induisant une perte de fonction d'IRS-1 (*kl-/- irs-1 +/-*) (*Insulin Receptor Substrate 1*, une protéine adaptatrice qui permet la transduction des signaux initiés par IGF-1 et l'insuline) ont une espérance de vie améliorée par rapport aux animaux *kl-/-*. De plus, certains phénotypes sont atténués tels que l'artériosclérose, les calcifications ectopiques, l'atrophie de la peau et l'hypogonadisme [171].

Klotho n'affecte pas la fixation des ligands mais réduit l'activation par phosphorylation des récepteurs et des voies en aval [171]. Depuis la découverte de l'action de Klotho sur la voie IGF-1, de nombreuses études ont rapporté la diminution de l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), notamment dans les modèles de cancers où ces voies sont hyperactivées car impliquées dans la croissance tumorale et la survie [172] (**Figure 15**).

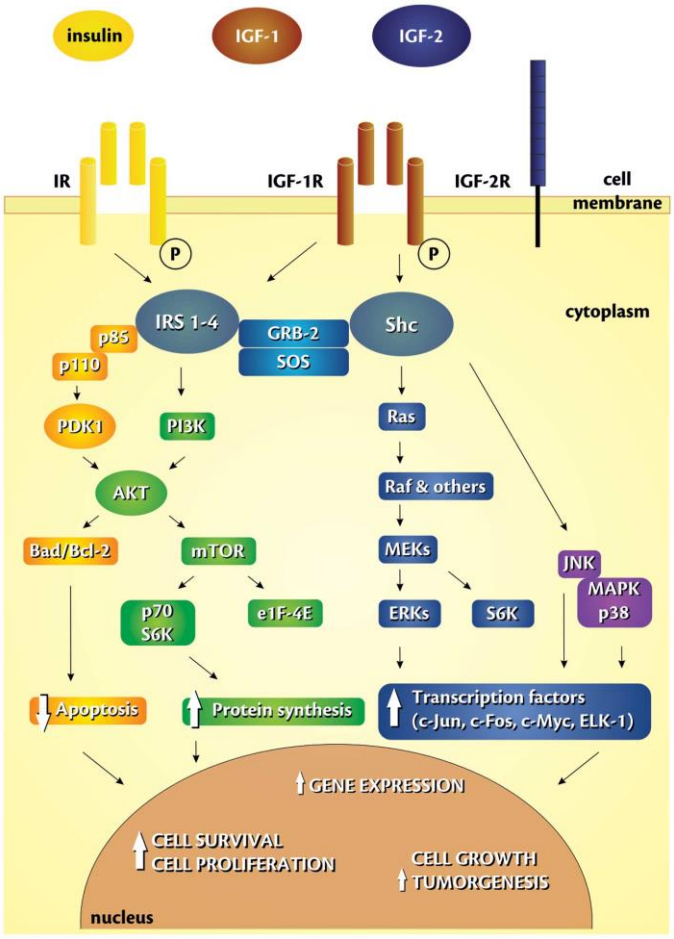


Figure 15 *Voies de signalisation activées par les ligands insuline et IGFs, favorisant la croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose (extrait de Kasprzak et Adamek, 2016, International Journal of Oncology)*

La nature de l'action de Klotho sur le récepteur d'IGF-1 (IGF-1R) est encore inconnue, bien que son activité sialidase puisse être impliquée dans la modification de la glycosylation du récepteur. En effet, IGF-1R possède de nombreux sites de N-glycosylations, modulant par exemple sa présence à la membrane plasmique comme dans le cas des cellules de sarcome d'Ewing [173]. De plus, il a été montré que les souris surexprimant la sialidase NEU3 développent un phénotype diabétique dû à une résistance à l'insuline [174].

Bien que la déglycosylation directe d'IGF-1R par Klotho n'ait pas encore été démontrée, son interaction avec les radeaux lipidiques livre un mécanisme d'action quant à son effet inhibiteur de la phosphorylation d'AKT/PKB (Protéine Kinase B) par la PI3K [168]. De plus, en inhibant le recrutement de la PI3K, Klotho réprime aussi l'exocytose de TRPC6 induite par IGF-1 et protège ainsi de l'hypertrophie cardiaque, favorisée par TRPC6 [175].

Klotho n'a pas établi la première connexion entre l'axe insuline/IGF-1 et la longévité. Dans le règne animal, la chauve-souris *Myotis brandtii* fait preuve d'une exceptionnelle longévité par rapport à sa petite taille. Le séquençage de son génome a révélé, outre les adaptations telles que l'hibernation et un taux de reproduction réduit, une altération génétique unique des récepteurs GH-R (*Growth Hormone Receptor*, qui permet la production d'IGF-1) et d'IGF-1R, conduisant à une altération de l'axe GH/IGF-1 [176]. Le rat-taupe-nu, très étudié car doté d'une longévité et d'une résistance au stress remarquables, présente lui aussi une réduction de l'expression des gènes de la signalisation de l'insuline/IGF-1 dans le foie [177]. D'autre part, du nématode *C. elegans* [178] aux mouches *D. melanogaster* [179] et aux mammifères [180–182], de nombreux modèles animaux de longévité ont été établis et partagent l'altération de l'axe GH/IGF-1 (ou leurs orthologues) (**Figure 16**).

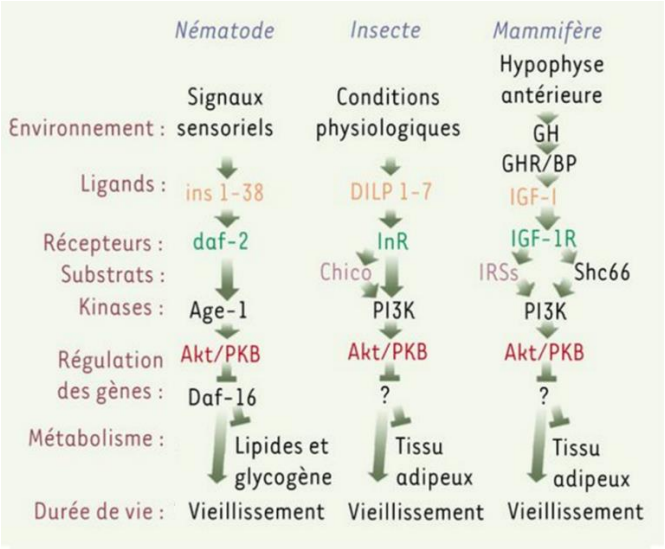


Figure 16 *Présentation des orthologues de l'axe GH/IGF-1 chez les nématodes et les insectes dont la mutation promeut la longévité de ces animaux (extrait de Kappeler et al, M/S : médecine sciences, 2006)*

Chez les mammifères, diverses mutations affectent les récepteurs GH-R, IGF-1R, IR (*Insulin Receptor*), leurs effecteurs ($p66^{shc}$) ou les régulateurs (*Prop-1, Pit1*) de la formation de l'hypophyse, l'organe qui produit la GH (**Figure 17**).

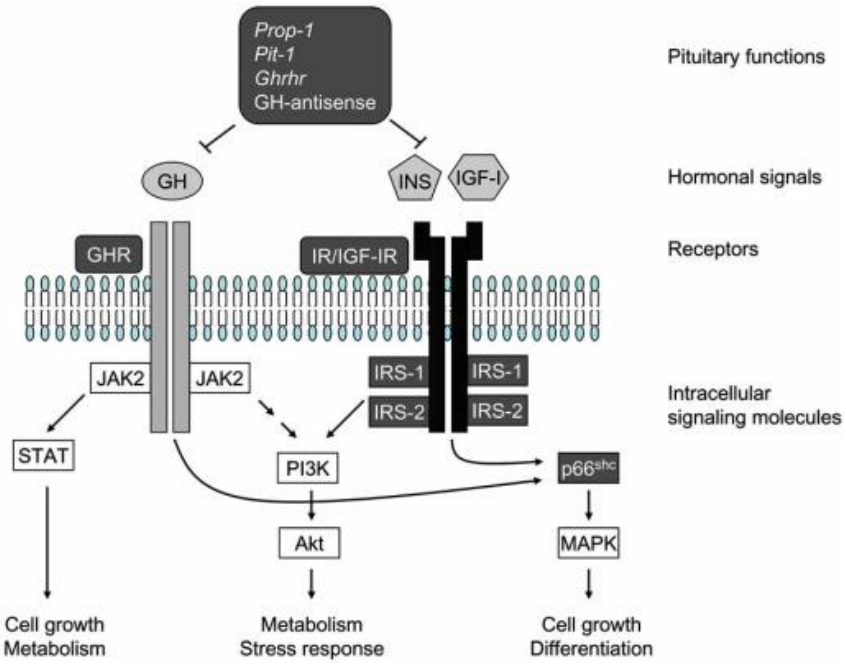


Figure 17 *Schéma des différentes mutations (sur fond gris foncé) affectant les voies de signalisation de l'axe GH/IGF-1 chez les mammifères. (extrait de Chiba et al, Curr. Genomics, 2007)*

Beaucoup de ces mutants se révèlent être résistants à de nombreuses formes de stress, notamment le stress oxydatif mais également les irradiations UV [183] (**Tableau 3**).

Tableau 3 *Présentation des différents modèles animaux dont la mutation de l'axe GH/IGF-1 confère une résistance au stress*

Modèle animal et gène muté	**Augmentation de la longévité (%)**	**Résistance cellulaire**
Souris « Ames dwarf », *Prop1*	49-68	UV, H_2O_2, paraquat, cadmium (métal se substituant au Ca^{2+})
Souris, *Igf-1r +/-*	16-33	H_2O_2, paraquat
Souris, *Ghr-/-*	37-55	UV, H_2O_2, paraquat, mais pas cadmium
Souris surexprimant *kl*	19-31	H_2O_2, paraquat
Souris, *p66^{shc}-/-*	28	H_2O_2, paraquat, UV
Souris « Snell dwarf », *Pit1*	42	UV, H_2O_2, paraquat, 3-NPA, cadmium, chaleur, méthyl-méthanesulfonate (agent alkylant), actinomycine D '(intercalant de l'ADN), arrêt du cycle cellulaire induit par l'O_2 ambiant, **sensibilité accrue au stress réticulaire (thapsigargine, tunicamycine)**
C. elegans, *daf-2* (orthologue de *IR* et *IGF-1R*)	100	UV, paraquat, chaleur, métaux lourds, hypoxie
C. elegans, *age-1* (sous-unité de la PI3K)	65-110	UV, H_2O_2, paraquat, chaleur
Drosophila, *chico+/-* (orthologue de IRS, I*nsulin Receptor Substrate*)	13-31	paraquat

Les mécanismes de longévité majeurs sont les stratégies de réparation de l'ADN ainsi que la réduction des ROS, qui elles-mêmes induisent des dommages à l'ADN et altèrent le métabolisme mitochondrial. La lutte contre le stress oxydatif converge vers les facteurs de transcription FOXO [184] et l'expression d'enzymes telles que les superoxyde dismutases (SOD), catalase etc…, tous régulés par la voie insuline/IGF-1, elle-même inhibée par Klotho (**Figure 18**).

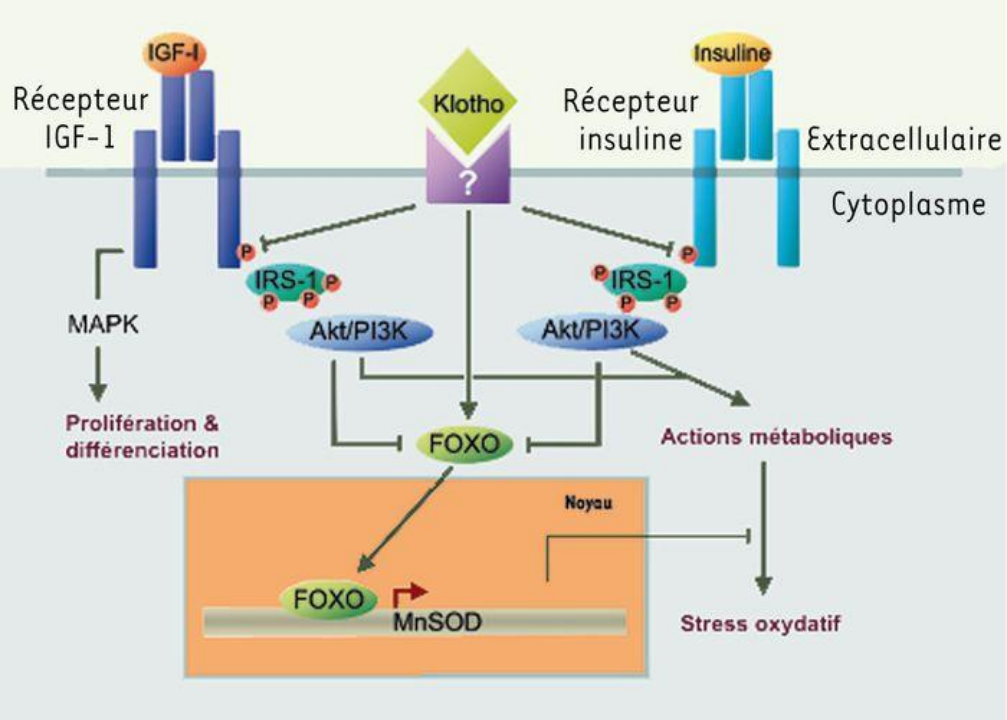


Figure 18 *Klotho favorise la résistance au stress oxydatif en levant l'inhibition de FOXO exercée par AKT (extrait de Kappeler et al, M/S : médecine sciences, 2006)*

L'inhibition d'AKT, également induite par la restriction calorique [185,186], est donc essentielle à la réduction du stress oxydatif. En outre, suite à un traitement à l'acide 3-nitropropionique engendrant la production de ROS, une plus faible activation de la voie des MAPK (3-NPA), est également constatée dans les souris *snell dwarf* par rapport à des souris contrôles (« sauvages ») [187]. Une diminution du niveau des ROS dans la cellule, associée à l'inhibition d'AKT, contribue donc aussi à la réduction de l'activation des MAPK [188].

Enfin, l'interactome des acteurs impliqués dans la longévité des modèles murins fait apparaître les éléments du stress du réticulum endoplasmique (RE) [183], organite de la synthèse et de la maturation des protéines (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

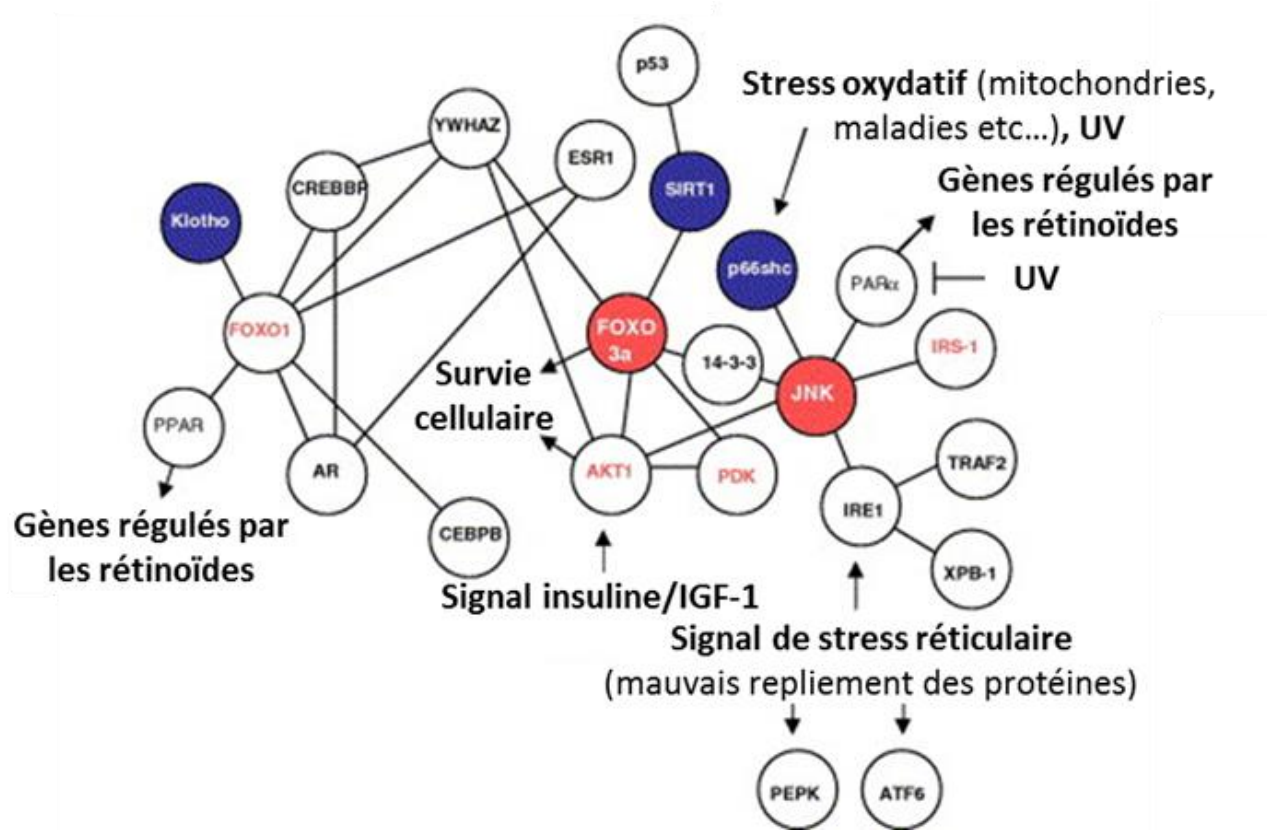


Figure 19 *Interactome de la voie insuline/IGF-1-FOXO dans la longévité. Les acteurs clés sont en rouge, ceux impliqués dans l'extension de l'espérance de vie des modèles murins sont en bleu. (adapté de Murakami, Experimental Gerontology, 2006)*

De nombreuses maladies métaboliques ou inflammatoires telles que l'obésité induisent un stress du RE. L'activation de ce dernier prolonge l'espérance de vie mais est également impliquée de façon complexe dans les maladies liées à l'âge, telles que le cancer.

La voie IGF-1 protègerait de l'apoptose induite par le stress du RE en augmentant la capacité adaptative du RE, *via* l'expression de la protéine chaperonne BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein) [189] et la potentialisation de l'activation des voies de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) [190], présentée dans la **Figure 20**. De plus, les fibroblastes issus des souris *snell dwarf* déficientes en IGF-1 sont plus sensibles au stress du RE induit par la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCAs qui induit une déplétion du Ca^{2+} réticulaire), observation que les auteurs expliquent par l'épissage réduit d'XBP-1 (*X-Box Binding Protein 1*) [191]. En apparente contradiction, dans les nématodes *C. elegans* mutants pour insuline/IGF-1, XBP-1 collabore avec FOXO pour augmenter la résistance au stress réticulaire [192]. Le rôle de Klotho dans le stress RE n'est pas encore élucidé, bien que quelques études rapportent un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par le stress du RE *in vitro* [193] et *in vivo* dans le contexte de lésions cardiaques [194] et de la fibrose rénale [195].

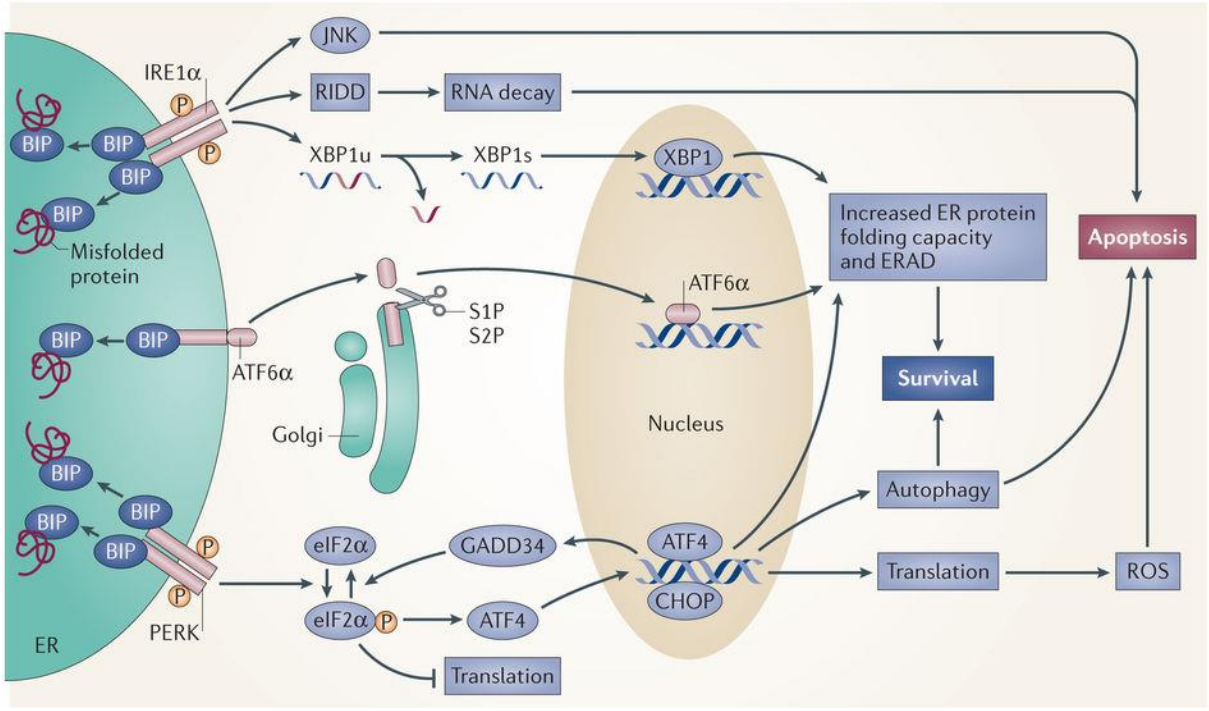


Figure 20 *Le stress réticulaire active les trois bras de l'UPR : IRE1α, ATF6α et PERK qui activent à la fois des voies pro-survie et pro-apoptotiques, dont la balance scelle le destin cellulaire. (extrait de Wang et Kaufman, Nature Reviews Cancer, 2014)*

Dans le règne animal, l'inhibition de l'axe GH/IGF-1 est donc un mécanisme universel de longévité, qui permet d'augmenter la résistance au stress oxydatif à l'échelle de l'organisme et de réguler l'homéostasie protéique de la cellule.

Chez l'humain, le rôle de l'axe GH/IGF-1 est illustré par les patients atteints du syndrome de Laron, une déficience congénitale en IGF-1 due à une mutation ou une délétion homozygotes dans le gène codant pour GH-R [196]. Les symptômes les plus évidents sont le nanisme et l'obésité, sans développement de diabète de type 2. L'analyse de l'expression des gènes de ces patients a démontré une surexpression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), l'inhibiteur de la PI3K, ainsi qu'une réduction de l'expression des gènes codant pour la cyclinA1 (impliquée dans le cycle cellulaire) et SP1, considéré comme un oncogène potentiel (et régulateur de *KL*). Les études épidémiologiques ont révélé que ces patients étaient protégés des risques de cancer, un résultat cohérent avec les nombreuses études rapportant le rôle de la signalisation d'IGF-1 et des ROS dans l'oncogenèse et la progression tumorale.

Cette protection contre les cancers est aussi constatée dans les souris « *Snell dwarf* », « *Ames dwarf* » et *Ghr-/-* dans le cas de tumeurs spontanées [197], induites par des agents chimiques [198] ou greffées [199] et contribue à leur longévité [181].

De fait, par son action inhibitrice de la voie de l'insuline/IGF-1, Klotho non seulement favorise la longévité, mais assure aussi un rôle suppresseur de tumeur dans de nombreux types de cancers [172]. Toutefois, cette action antitumorale de Klotho ne se limite pas à IGF-1 mais concerne également d'autres facteurs de croissance, qu'elle régule aussi bien dans des contextes physiologiques que pathologiques.

b) Klotho inhibe la signalisation d'autres facteurs de croissance et de cytokines

Une des voies de signalisation majeure inhibée par Klotho est la voie induite par les ligands Wnt, dont la fixation sur leur récepteur libère de son complexe de dégradation la β-caténine qui, une fois au noyau, va activer la transcription de gènes cibles impliqués dans le développement, le renouvellement des cellules souches, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial Mesenchymal Transition*) et la sénescence (**Figure 21**).

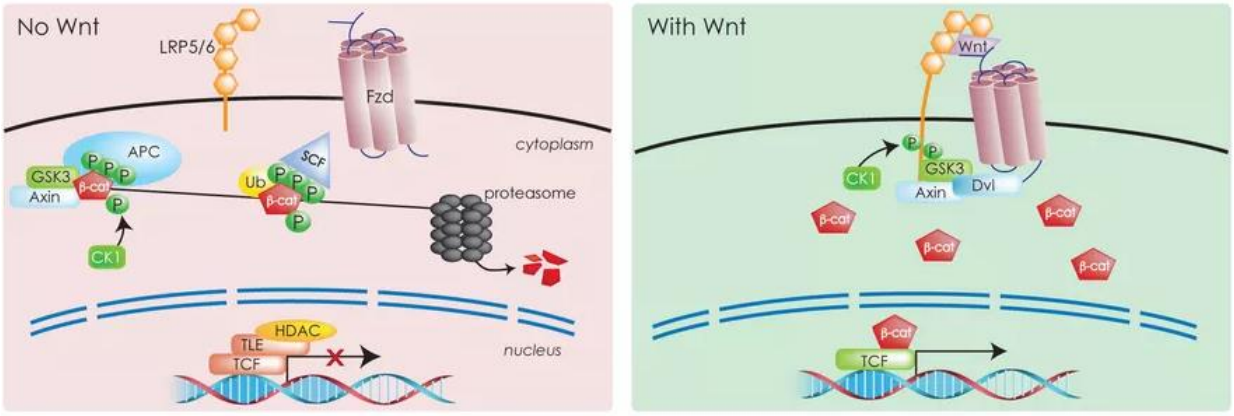


Figure 21 *La fixation d'un ligand Wnt sur le complexe Frizzled (FZD)-LRP5/6 (Low density lipoprotein receptor-Related Proteins) empêche la dégradation de la β-caténine. Après translocation au noyau, celle-ci active la transcription des gènes cibles. (extrait de www.caymanchem.com/Article/2189)*

Contrairement à ce qui a été décrit pour IGF-1, les formes membranaires et solubles de Klotho agissent en se liant aux ligands Wnt, empêchant ainsi l'activation de la voie. Il a été démontré que Klotho interagissait grâce au domaine KL1 aux ligands Wnt1, Wnt3, Wnt4 et Wnt5a [200]. Etant donné le rôle important de la signalisation Wnt dans la physiologie, cette interaction a de nombreuses implications tant au niveau physiologique que dans le cadre de pathologies.

La voie Wnt peut être activée par la fixation de l'Angiotensine II sur son récepteur AT1-R. Dans les cardiomyocytes de rat, en inhibant AT1-R et l'activation de la β-caténine qui en découle, Klotho inhibe l'hypertrophie cardiaque [201]. Le blocage du système rénine-angiotensine

est une stratégie impliquée dans l'augmentation de la longévité qui résulte en une diminution des ROS ainsi qu'une amélioration du métabolisme mitochondrial [202], en faisant intervenir notamment mTOR, Klotho et les sirtuines [203]. Il est à noter que l'Angiotensine II réduit l'expression rénale de Klotho mais que le losartan (Cozaar, utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle), un bloqueur des récepteurs de l'Angiotensine II, restaure la transcription de *KL* [111].

D'autre part, Wnt est indispensable au renouvellement et à la différenciation des cellules souches dans de nombreux tissus. Toutefois, une activation excessive de la voie conduit d'une part à l'induction de la sénescence *in vitro* et *in vivo* [200], et d'autre part à l'épuisement des stocks de cellules souches ainsi qu'à une différenciation altérée des progéniteurs.

Dans les souris *kl-/-*, l'atrophie de la peau est notamment due à une absence presque totale du tissu adipeux sous-cutané [79]. Ceci est dû à l'hyperactivation de Wnt en l'absence de Klotho, ainsi qu'à un rôle indépendant de Klotho dans les phases précoces de la différenciation adipocytaire, dans la maturation des adipoblastes et la maintenance du caractère souche *via* PPARγ, décrit par plusieurs études [204–206].

De plus, la masse osseuse, également régulée par Wnt, est modifiée dans les souris déficientes pour *kl* du fait d'une altération de la différenciation des ostéoclastes et ostéoblastes, les cellules assurant le remodelage du tissu osseux.

De façon similaire, la maturation et la myélinisation des oligodendrocytes, affectées par Wnt [207], sont améliorées par Klotho [208,209], offrant donc de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les maladies neurodégénératives.

Une augmentation de la voie Wnt parallèlement à la diminution de Klotho est aussi associée aux lésions rénales [112], ainsi qu'à l'altération de la régénération du muscle [210,211]. Lorsqu'exprimée par un transgène, Klotho améliore la fonction musculaire, réduisant la perte du muscle et augmentant le nombre de cellules satellites (nécessaires à la régénération du muscle) dans les souris *mdx*, modèles murins pour la dystrophie musculaire de Duchenne [211]. Dans les stades plus tardifs, la fibrose du tissu musculaire était réduite par Klotho *via* la double inhibition de Wnt et TGFβ1 (*Transforming Growth Factor β1*).

Enfin, l'importance du rôle inhibiteur de Klotho sur Wnt a également été mise en évidence dans le contexte de l'hépatocarcinome [212], un résultat attendu étant donné le rôle de

Wnt dans la progression tumorale [213] *via* l'angiogenèse ou encore l'EMT, mécanisme auquel TGFβ1 prend part également.

Klotho interagit avec le récepteur TGFβ-R de type II (TGFβ-R2), contrecarrant de cette façon la liaison de son ligand et inhibant la fibrose rénale ainsi que le développement métastatique chez les souris ayant reçu, par injection, la forme sécrétée de Klotho [214,215]. L'inhibition de TGFβ1 par Klotho serait également impliquée dans la régulation de la différenciation adipogénique [206].

Outre son rôle sur les voies Wnt et TGFβ régulant la différenciation et l'EMT, des processus participant notamment à l'oncogenèse et la progression tumorale, Klotho réduit l'activation de NFκB, de l'enzyme eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) et l'expression des molécules d'adhésion induites par la cytokine TNFα (*Tumorosis Necrosis Factor α*) [216]. Par conséquent, Klotho remplit aussi un rôle anti-inflammatoire, une propriété qui participe à son rôle protecteur contre les cancers et la fibrose.

De plus, en conséquence de son rôle de corécepteur, il a été rapporté que Klotho réduisait la liaison de FGF2 à FGFR1 du fait de la compétition avec FGF23, protégeant ainsi de la fibrose rénale [217]. Les formes solubles et membranaires réduisent également l'activation de la voie FGF2 (=bFGF) dans le cancer pancréatique grâce à l'inhibition d'ERK1/2 [137]. En revanche, il a été montré *in vitro* sur des cellules HEK263 surexprimant *KL* qu'en plus de βKlotho, αKlotho pouvait également interagir avec FGF19 et transduire son signal [94]. Cependant, les conséquences de cette interaction sur la physiologie n'ont pas encore été étudiées.

Enfin, comme évoqué précédemment dans la régulation des canaux ioniques, Klotho favorise l'internalisation du récepteur au VEGF. On constate donc une corrélation négative entre l'expression de *KL* et celle de *VEGF* dans les maladies rénales [166].

Klotho exerce donc des rôles variés du fait des nombreuses voies de signalisation qu'elle régule, soit dans les tissus qui l'expriment, soit grâce à sa forme circulante. Cette modulation fait intervenir soit une interaction physique avec un de ses domaines, soit son activité enzymatique (**Figure 22**).

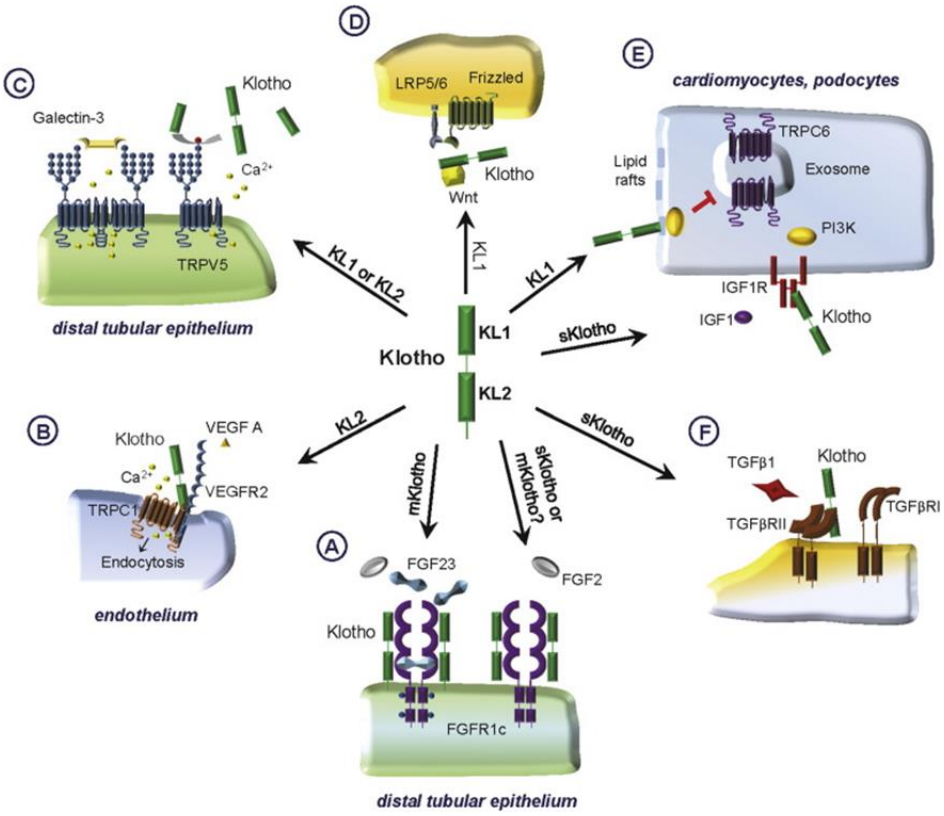


Figure 22 *Klotho régule de nombreuses voies de signalisation grâce aux interactions avec son domaine KL1, KL2, les deux domaines à la fois ou via son activité sialidase. (extrait de Mencke et al, Advanced Grug Delivery Reviews, 2017)*

Ces différents récepteurs sont essentiels pour de nombreux processus physiologiques, mais sont également altérés dans certaines pathologies. Par ailleurs, bien que tous soient décrits comme participant aux mécanismes de chimiorésistance dans les sarcomes (et bien d'autres cancers), leur hyperactivation dans une cellule saine génère un stress, par exemple oxydatif dans le cas d'IGF-1. En inhibant leur hyperactivation, Klotho exerce donc un rôle protecteur dans l'organisme.

3) La modulation des voies de signalisation par Klotho offre une protection contre divers stress et améliore le fonctionnement de certains organes

a) Protection de l'endothélium vasculaire

Une réduction de l'expression de *KL* est associée à un risque élevé de maladies cardio-vasculaires [218,219]. Dans les souris *kl-/-*, il a été démontré que la vasodilatation induite par la production d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium vasculaire, en réponse à l'acétylcholine, était réduite [220]. La signalisation dépendante du NO est importante pour l'angiogenèse et la vasculogenèse, qui toutes deux sont altérées dans les souris *kl-/-* [221]. De plus, les auteurs, en délivrant par adénovirus l'expression de *kl* à des rats modèles pour l'athérosclérose, ont apporté

la preuve que Klotho stimulait la production de NO par l'endothélium vasculaire [222]. Le mécanisme est encore inconnu mais serait indépendant de la vitamine D et des phosphates. Klotho protège ainsi contre le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire.

b) Klotho protège du stress oxydatif

Les souris déficientes pour le gène *kl* présentent, dans l'hippocampe, des niveaux importants de peroxydation de l'ADN et des lipides dès 5 semaines après la naissance, soit 2 semaines avant de manifester des altérations des fonctions cognitives associées à l'apoptose des neurones. Le traitement avec un antioxydant prévient les défauts de cognition et réduit la mort neuronale [223]. Ces observations soulignent l'importance de Klotho vis-à-vis du stress oxydatif dans le système nerveux.

Toutefois ses effets antioxydants ne se limitent pas à l'hippocampe. La surexpression de *kl* dans des souris augmente leur espérance de vie de 20 à 30%, notamment *via* l'inhibition de la signalisation insuline/IGF-1 [171], qui est connue comme impliquée dans la longévité et notamment le stress oxydatif. En effet, la voie dépendant d'IGF-1 inhibe les facteurs de transcription FOXOs qui régulent l'expression de l'enzyme mitochondriale manganese superoxide dismutase (SOD2 ou MnSOD). Ces souris présentent d'ailleurs un taux de 8-OHdG urinaire (un marqueur des dommages à l'ADN dus au stress oxydatif) réduit de moitié, une élévation de l'expression de la SOD2 et résistent plus longtemps que les souris sauvages à des doses létales de paraquat, un pesticide entraînant un stress oxydatif [224]. Klotho a donc une action antioxydante à l'échelle de l'organisme, promouvant ainsi la longévité.

Par ailleurs, IGF-1 est décrit comme régulant négativement l'expression de la sirtuin1 (SIRT1), qui elle-même est impliquée dans la longévité, la résistance contre le stress oxydatif et stimule l'expression de *KL* [101].

Dans les cellules rénales, Klotho favoriserait aussi l'expression du récepteur de l'érythropoiétine (EpoR), dont la signalisation protège de l'exposition à H_2O_2 [225].

Enfin, Klotho inhibe également les ROS induites par l'Angiotensine II. Dans les cellules HUVECs (*human Umbilical Vein Endothelial Cells*), cette diminution des ROS passe par une augmentation de l'AMP cyclique et de la production de NO, tous deux favorisant l'expression de la SOD2 [226]. En régulant la balance des ROS, Klotho participe ainsi d'une façon de plus à la protection de l'endothélium vasculaire. Enfin, dans les cellules musculaires lisses aortiques, la forme soluble de Klotho inhibe la sénescence et l'apoptose induites par l'Angiotensine II en

augmentant l'expression du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) favorisant l'expression des enzymes antioxydantes HO-1 (*haeme oxygenase*) et Prx1 (peroxiredoxin-1) [227].

c) Klotho améliore la cognition

Les souris *kl-/-* présentent un retard mental et des défauts de cognition associés notamment, comme présenté précédemment, à une mort des neurones de l'hippocampe du fait d'un stress oxydatif qui apparaît dès 5 semaines [223].

Mais outre son rôle antioxydant, il a également été démontré que Klotho était indispensable à la neurogenèse post-natale. Dans les souris déficientes pour *kl*, on constate une réduction de la prolifération des cellules souches neuronales et de la maturation des progéniteurs de l'hippocampe [228]. Les mêmes auteurs restaurent *in vitro* la prolifération et le renouvellement de neurosphères en ajoutant la protéine recombinante soluble dans le milieu. Enfin, ils montrent que la surexpression de *kl* augmente la génération de nouveaux neurones et l'arborisation dendritique, non pas chez les jeunes souris adultes mais à partir de 6 mois, réduisant ainsi le déclin de la mémoire spatiale avec l'âge.

Par ailleurs, dans des modèles murins, Klotho améliore la voie glutamatergique en augmentant la présence des récepteurs NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) et de la sous-unité GluN2B dans les régions post-synaptiques. Elle favorise ainsi la communication et la plasticité synaptique dans des modèles murins de maladies neurodégénératives similaires aux maladies de Parkinson et d'Alzheimer [131,209,229] (**Figure 23**).

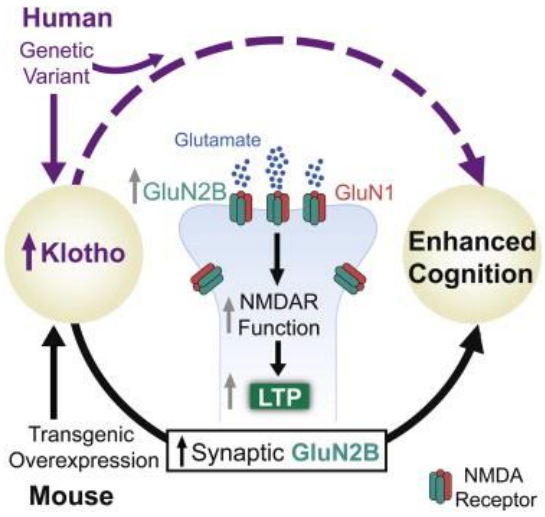


Figure 23 *Klotho améliore la cognition en enrichissant les synapses des neurones de l'hippocampe en récepteurs NMDA et sous-unités GluN2B (extrait de Dubal et al, Cell Reports, 2014)*

Cet effet neuro-protecteur est également observé avec l'injection dans les souris d'un fragment de la protéine murine constitué des domaines KL1 et KL2, bien que ce dernier ne parvienne pas à traverser la barrière hémato-encéphalique [230]. Ceci révèle un effet à distance de Klotho sur le système nerveux. Il est à noter que l'injection de la protéine humaine n'a pas d'effet stimulateur de la cognition sur la souris, ce qui pourrait s'expliquer soit par des différences biologiques entre souris et humain pour l'action de Klotho, soit par les différences de séquence qui pourraient aussi être à l'origine de rôles différents. Toutefois, le variant KL-VS, qui entraîne une augmentation des taux de Klotho sérique, est associé à une meilleure cognition chez l'homme dans trois cohortes indépendantes [131], renforçant ainsi l'intérêt de l'étude de Klotho dans les maladies neurodégénératives et neurologiques.

d) Klotho réduit l'inflammation

Le premier lien entre Klotho et l'immunité fut suggéré par l'observation des souris déficientes pour *kl* : leur involution thymique, un processus physiologique qui consiste en la régression progressive du thymus avec l'âge, débutait de façon prématurée [79]. Par la suite, il a été montré que l'absence de Klotho augmentait l'apoptose des lymphocytes T, suite à une septicémie, ainsi qu'une élévation des cytokines inflammatoires [231]. De plus, le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse est également altéré par un déficit en Klotho [232].

Il s'est avéré que l'expression *KL* est inhibée par les voies de signalisation inflammatoires de l'IFNγ (*Interferon γ*) et de TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) *via* la production de NO et l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) dans les pathologies telles que la colite, une inflammation du colon [233]. Klotho inhibe la signalisation induite par TNFα en réduisant l'activation par phosphorylation de RelA (ou p65, sous-unité de NFκB) et sa fixation à la chromatine [234]. Réciproquement, les cytokines de la même famille TNFα et TWEAK (T*umor necrosis factor-like WEAK inducer of apoptosis*) répriment l'expression de *KL* par la fixation de RelA à son promoteur [113].

Enfin, Klotho, par une action intracellulaire, bloque la multimérisation de RIG-1 (*Retinoic acid Inducible Gene 1*), qui stimule la production des cytokines pro-inflammatoires IL6 et IL8 (interleukines 6 et 8), et protège ainsi de la sénescence induite par l'inflammation[235].

e) Klotho protège de la sénescence

Le rôle de Klotho face à la sénescence s'inscrit pleinement dans ses propriétés anti-vieillissement et est notamment lié à son action protectrice vis-à-vis du stress oxydatif et de

l'inflammation. Ainsi par exemple, Klotho inhibe *in vitro* et *in vivo* l'activation de RIG-1 lors de la sénescence réplicative [235]. De même, la forme soluble réduit la sénescence et l'apoptose induites par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [236] ou TNFα [237] dans les cellules HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

Lors de l'exposition à H_2O_2, la protéine recombinante Klotho réduit l'induction de p53 et p21 [238], les régulateurs bien connus du cycle cellulaire et de la sénescence [239]. Ce rôle inhibiteur de Klotho sur la voie p53/p21 a également été rapporté dans une lignée de fibroblastes humains MRC-5, dans laquelle l'inhibition de *KL* par ARN interférence induit un phénotype sénescent avec activité de la β-galactosidase [240]. Les auteurs suggèrent que cette induction de p53 serait due à la réactivation de la signalisation insuline/IGF-1, qui inhibe le facteur de transcription FOXO3 et entraîne la sénescence par accumulation de p21.

Enfin, il a été démontré que Klotho protégeait les cellules endothéliales de la sénescence induite par la présence d'un sérum urémique, c'est-à-dire provenant d'un contexte d'insuffisance rénale, en diminuant la liaison de NFκB à l'ADN [241].

En conclusion, Klotho agit dans la totalité de l'organisme, bien que tous les tissus ne l'expriment pas, grâce à ses formes circulantes. Elle favorise la longévité par la régulation de l'homéostasie minérale et la modulation de la signalisation de certains facteurs de croissance et cytokines. Ses actions multiples offrent une protection contre divers stress, notamment oxydatif, et l'impliquent dans des fonctions physiologiques (vasodilatation, cognition, immunité, …) et cellulaires (prolifération, différenciation, sénescence, …) par des mécanismes qui ne sont encore que partiellement connus. Le caractère ubiquitaire de son action ainsi que la nature de ses cibles (signalisation des RTK, p53, NFκB, …) ont rapidement motivé son étude dans le contexte des cancers.

III. Au travers de l'ensemble de ses fonctions, Klotho agit comme un suppresseur de tumeur

Etant donné les effets pléiotropes de Klotho dans l'organisme, ainsi que la nature des voies qu'elle inhibe (IGF-1, Wnt, TGFβ…), les laboratoires n'ont pas tardé à s'intéresser au rôle qu'elle pouvait avoir sur l'oncogenèse et la progression tumorale. Son rôle essentiel sur la signalisation de l'insuline/IGF-1, notamment, laissait entrevoir un potentiel rôle suppresseur de tumeur. En effet, des modèles animaux présentant une déficience en IGF-1 ainsi que les patients atteints du syndrome de Laron sont résistants aux cancers. Bien que les souris *kl-/-* ne

développent pas de tumeurs, il se peut que cela s'explique par le fait que leur durée de vie est trop courte pour pouvoir observer une néoplasie spontanée. Dans cette partie seront présentées les études concernant l'expression de *KL* et son impact sur le pronostic des patients ainsi que sur les caractéristiques malignes de nombreux types de cancers.

1) L'expression de KL est altérée dans de nombreux cancers et corrélée aux données cliniques

Une des caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeur est d'être sous-exprimé dans le tissu tumoral en comparaison avec le tissu sain adjacent. Cette observation se vérifie pour *KL* dans de nombreux types de cancer incluant : l'adénocarcinome pancréatique [137,143], le carcinome à cellules rénales [242], le cancer colorectal [139,243], la cancer gastrique [135], le cancer du sein [140,244], le carcinome cervical [142], le cancer épithélial ovarien [245], le carcinome hépatocellulaire [212], le carcinome de l'œsophage [246] et les tumeurs cérébrales [247]. La diminution de son expression est principalement due à la régulation épigénétique (hyperméthylation du promoteur et désacétylation des histones) ainsi qu'à des miRNA, comme évoqué précédemment.

Toutefois, quelques travaux ne retrouvent pas ce résultat. C'est le cas de l'étude de Feng *et al* (2013) [248]: ils ont constaté par immunohistochimie un marquage de Klotho hétérogène allant de modéré à faible dans des coupes d'épithélium sain. En revanche, ils ont constaté dans 11 échantillons de tumeurs primaires de la prostate un marquage fort. Enfin, 16 échantillons de cancer prostatique métastatique sur 20 présentaient un marquage fort, ainsi que 2 marquages modérés. Ces observations ont amené les auteurs à considérer l'expression de *KL* dans le tissu tumoral comme un marqueur de l'agressivité des cellules lié à la signalisation FGF19. Toutefois, ils constatent aussi une expression de βKlotho dans certaines tumeurs primaires, alors que l'épithélium sain ne l'exprime pas. De même, la base Oncomine révèle que *KLB* est plus fortement exprimé dans le cancer de la prostate que dans le tissu sain. Il reste donc à clarifier les conséquences de la forte expression de *KL* dans les tumeurs prostatiques métastatiques sur un plus grand nombre d'échantillons ainsi que le rôle de βKlotho dans cette pathologie.

De façon similaire, une forte expression de *KL* serait corrélée à une plus faible survie des patients atteints d'hépatomes [249]. Elle serait en outre associée à la cirrhose du foie, la multiplicité des tumeurs, ainsi que l'invasion veineuse.

Dans le cancer de l'ovaire également, en contradiction apparente avec l'étude de Lojkin *et al* (2015) qui montre une diminution de l'expression de *KL* dans les tumeurs ovariennes de haut grade [245], l'augmentation de l'expression de la forme soluble de Klotho (KLs), mais non membranaire, serait associée à un risque plus élevé de progression de la maladie et du décès du patient [250]. Par ailleurs, l'expression de KLs est aussi positivement corrélée à l'expression d'IGF-1 et IGFBP3 (*IGF-Binding Protein-3*), ce qui pourrait suggérer que l'augmentation de KLs serait soit un mécanisme de compensation dû à l'abondance d'IGF-1, soit le signe d'une sensibilité réduite des cellules à Klotho. Ces divers points sont donc à éclairer dans le futur.

Malgré ces résultats dans les hépatomes, les cancers de la prostate et de l'ovaire, la majorité des études rapporte une corrélation positive entre l'expression de *KL* dans les tumeurs et le pronostic du patient ou des données anatomopathologiques en sa faveur.

Ainsi, dans le cancer du sein, l'expression de *KL* serait négativement corrélée à la taille de la tumeur et au marquage Ki67 [244] ainsi qu'à l'hyperplasie modérée et canalaire atypique [140].

Dans le cancer gastrique, le degré de méthylation du promoteur de *KL* est négativement corrélé à la survie des patients [135]. Le miR-199a-5p ciblant *KL* est aussi associé à la dissémination des cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques ainsi qu'aux stades TNM (*Primary Tumor - Node - Metastasis*) avancés [145]. De la même façon, malgré les résultats de Feng *et al* (2013) sur le cancer de la prostate [248], l'hyperméthylation du promoteur de *KL* associée à la réduction de son expression est négativement corrélée à la survie globale des patients atteints d'adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) et au grade histologique [143]. Cette perte de l'expression de *KL* est également associée à une augmentation de celle d'IGF-1R et de miR-504 dans les tumeurs de PDAC.

Dans le cas du carcinome hépatocellulaire (HCC), la méthylation du promoteur de *KL* serait associée à une perte de son expression ainsi qu'à un mauvais pronostic [144]. La sous-expression de *KL* dans les tumeurs d'HCC serait corrélée au grade histologique et clinique des tumeurs, ainsi qu'à la survie globale des patients [212]. Dans cette même étude, de façon similaire à ce qui avait été observé par Lu *et al* (2008) dans le cancer de l'ovaire [250], les auteurs constatent un taux de KLs sérique plus important chez les patients de HCC que chez des individus sains et proposent donc de l'utiliser comme biomarqueur pour l'HCC.

Une perte de l'expression de *KL* est aussi constatée dans le cas du carcinome cervical, non pas dans les échantillons à un stade de tumorigenèse pré-invasif [142], mais dans les tumeurs invasives [251], renforçant ainsi l'idée que la perte de l'expression de *KL* représente un avantage

sélectif lors de la progression tumorale. Cette observation est retrouvée dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) dans lesquels seulement 7 tumeurs sur 50 (14%) sont positives pour Klotho tandis que parmi les hyperplasies réactives, 16 sur 20 l'expriment (80%) [252]. De plus, l'absence de Klotho est associée à une plus faible médiane de survie des patients atteints de DLBCL, ainsi qu'à un grade de la classification d'Ann Arbor plus avancé. Dans le cancer colorectal également, une faible expression de Klotho est associée à un état plus avancé dans la classification de Dukes ainsi qu'à une profondeur d'invasion plus importante de la tumeur [243]. Son expression intra-tumorale est aussi réduite dans le cas du carcinome rénal, dans lequel le degré d'expression de *KL* est négativement corrélé à la taille de la tumeur, au grade TNM, au grade nucléaire ainsi qu'à la survie globale [242]. Dans les tumeurs avancées ayant perdu l'expression de *KL,* les auteurs constatent également une augmentation de l'abondance de p-AKT et de Snail, liés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

Enfin, l'expression de *KL* n'est détectée que dans 33% des carcinomes neuroendocrines du poumon, dans lesquels elle est positivement corrélée à une meilleure survie des patients [253]. Dans le cas des individus avec une dissémination dans les ganglions lymphatiques ou une angio-invasion, une forte expression de *KL* dans la tumeur primaire est associée à un meilleur pronostic. En outre, pour les patients atteints de cancer du poumon à petites cellules non métastatique ayant été opérés, Klotho est détectée dans le tissu tumoral de 60% d'entre eux et associée à une meilleure survie [254]. De plus, les auteurs avancent que seuls les patients exprimant *KL* ont bénéficié de la chimiothérapie péri-opératoire.

En conclusion, malgré quelques études suggérant le contraire, l'expression de *KL* est fréquemment altérée dans les tumeurs et sa perte est associée à un mauvais pronostic pour les patients. Les résultats en apparence contradictoires dans certains cancers pourraient s'expliquer par des contextes cellulaires différents et nécessitent une étude clinique approfondie des autres partenaires impliqués (comme βKlotho, les IGF circulants). Les observations cliniques en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur sont appuyées par les données accumulées *in vitro* et *in vivo* sur le rôle de Klotho dans la signalisation des cellules cancéreuses.

2) Klotho exerce son rôle suppresseur de tumeur via l'inhibition des facteurs de croissance

Afin d'élucider les mécanismes biologiques qui sous-tendent la valeur pronostique de Klotho dans les cancers, de nombreux travaux ont étudié l'impact de la surexpression ou de la

sous-expression de *KL* dans les lignées cellulaires cancéreuses sur leurs capacités tumorigéniques. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 *Principaux phénotypes obtenus après modulation de l'expression de KL dans des lignées cancéreuses*

Phénotype	Type de cancer
Klotho inhibe la prolifération cellulaire	Mammaire [244], colorectal [139,243], carcinome cervical [142,251], gastrique [135,136], pulmonaire [255–258], hépatique [212,259,260], pancréatique [137], thyroïdien [261], ovarien [245], lymphome diffus à cellules B (DLBCL) [252]
Klotho sensibilise à l'apoptose	Gastrique [135,136], pulmonaire [255,256,258,262], pancréatique [137], ovarien [245], hépatique [259], thyroïdien [261], DLBCL [252]
Klotho inhibe la migration et/ou l'invasion cellulaire	Pulmonaire [214,256], mélanome [263], carcinome cervical [251], hépatique [260], rénal [242], pancréatique [143], colorectal [243]

Un des rôles majeurs de Klotho dans la longévité est d'inhiber la voie de l'insuline/IGF-1. Or, cette dernière est impliquée dans de nombreux processus oncogéniques tels que la prolifération, l'EMT, le caractère souche des cellules tumorales, la reprogrammation métabolique et la résistance au traitement [264]. C'est donc en toute logique que face aux effets anti-prolifératifs, anti-migratoires et pro-apoptotiques de Klotho dans les cellules tumorales, son rôle vis-à-vis de la signalisation dépendant d'IGF-1R ait été investigué.

De fait, l'inhibition de la signalisation insuline/IGF-1 a été confirmée dans de nombreux modèles de cancers incluant les cancers mammaire, pulmonaire, hépatique, pancréatique, ovarien, colorectal, gastrique et le lymphome B [136,137,243–245,252,255,260] avec la mise en évidence de son interaction directe avec IGF-1R [244]. Certains résultats mentionnent l'inhibition de mTOR [136,260], activé par AKT et inhibiteur de l'autophagie. L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage des composants cellulaires. Elle est impliquée dans la chimiorésistance de nombreux cancers, mais peut également favoriser l'apoptose en fonction du contexte cellulaire [265]. Il paraît donc intéressant d'étudier l'impact de Klotho sur l'autophagie. Toutefois, les résultats diffèrent selon le modèle étudié [136,257,260], suggérant que les dialogues entre les différentes voies de signalisation sont responsables de l'activation ou l'inhibition de l'autophagie, et non une action directe de Klotho sur ce processus.

Les démonstrations du rôle suppresseur de tumeur de Klotho incluent la surexpression de sa forme membranaire ou le traitement des cellules avec la forme sécrétée, laissant entrevoir

des débouchés thérapeutiques possibles avec cette dernière. Le domaine KL1 serait suffisant pour beaucoup des effets suppresseurs de tumeur exercés par Klotho [137,142,244,246,252,256,259,263].

En effet, l'injection de la forme murine de KLs réduit la croissance tumorale de xénogreffes de cellules Panc1 [137], de cellules d'HCC [246] et de DLBCL [252]. De plus, Doi *et al* (2011) rapportent que le traitement de souris avec KLs après une xénogreffe de cellules A549 inhibe le développement de métastases dans les poumons et augmente substantiellement la survie des souris [214]. Cet effet est imputé au rôle inhibiteur de Klotho sur la voie induite par le TGFβ1, régulateur bien connu de l'EMT et qui interagit avec de nombreux acteurs de la voie IGF-1 [266]. En effet, les auteurs ont montré que Klotho, en interagissant avec TGFβR2, diminuait la fixation du facteur de transcription Smad2 sur l'ADN et réduisait ainsi l'expression des marqueurs de l'EMT et la migration induite par le TGFβ1. Etant donné le mauvais pronostic associé avec la progression métastatique, le rôle de Klotho sur les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses présente un intérêt majeur.

Cet aspect a d'ailleurs été étudié autant que la voie IGF-1. Les effets inhibiteurs de Klotho sur la motilité des cellules sont souvent attribués à la réduction de l'activation de la voie Wnt [142,246,251,256,259,263]. Wnt, en effet, est impliquée dans le caractère souche des cellules cancéreuse, la migration, la survie, mais également l'angiogenèse, un processus important pour la croissance de la tumeur et la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme [267]. L'inhibition de Wnt par Klotho résulte en l'inhibition de l'expression et de la translocation au noyau de la β-caténine [142,246,259] ainsi que la réduction de la transcription des gènes cibles c-Myc et CCND1 (codant pour la cycline D1) [142,246,251,259]. Elle agirait par son activité sialidase en promouvant l'internalisation de Wnt5a, avec lequel l'expression de *KL* est inversement corrélée dans le mélanome [263]. En effet, Wnt5a réduit l'expression de *KL* par l'activation de la Calmoduline-Kinase II (CaMKII) qui elle-même inhibe PPARγ [268]. Réciproquement, Klotho réduit l'expression de Wnt5a, comme le montrent les auteurs avec la formation d'organoïdes avec de mélanome, en présence de fibroblastes jeunes ou âgés produisant plus ou moins de KLs dans le milieu. Il s'agit du seul travail sur Klotho abordant l'importance du microenvironnement tumoral dans la croissance et la chimiorésistance des tumeurs. Pourtant, il est certain que cet aspect devra être creusé dans les temps à venir, en particulier au regard du rôle de Klotho sur l'inflammation, dont l'importance n'a cessé de croître ces dernières années dans la cancérologie [269,270].

Ces observations ont amené les auteurs à utiliser le rosiglitazone [268], un agoniste de PPARγ. Ce dernier restaure l'expression de *kl* dans le sérum et les tumeurs des souris,

augmentant en combinaison le bénéfice du PLX4720 (similaire au vémurafénib, un inhibiteur de l'enzyme codée par le gène *BRAF*) chez les souris âgées. Cette étude montre qu'il serait intéressant d'étudier le repositionnement de certaines molécules connues pour augmenter l'expression de *KL*, comme les glitazones et le losartan, pour des combinaisons avec des molécules chimiothérapeutiques. En effet, la surexpression de Klotho sensibilise à la cisplatine [245,257,262], au 5-Fluorouracile et à la gemcitabine [137], des agents cytotoxiques utilisés dans le traitement de nombreux cancers dont les sarcomes.

3) Autres effets de Klotho sur la signalisation de la cellule cancéreuse

Dans le carcinome rénal, Klotho inhibe l'EMT et la migration des cellules indépendamment de son activité sialidase [242]. Son action passerait par l'inhibition de la voie PI3K/AKT/GSKβ/Snail, dont une forte expression est retrouvée dans les tumeurs de grade élevé.

Concernant la sensibilisation à l'apoptose, des travaux montrent que Klotho réduit l'expression de l'anti-apoptotique Bcl-2 mais augmente celle du pro-apoptotique Bax [255,258]. Dans le DLBCL, elle réduirait l'expression de l'anti-apoptotique Mcl-1 [252]. Cet effet sur la balance entre pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 suggère une sensibilité accrue induite par Klotho à un grand nombre de drogues du fait de l'implication de la famille Bcl-2 dans l'apoptose, l'autophagie, mais également l'homéostasie calcique réticulaire et les échanges de calcium entre le RE et les mitochondries [271,272].

Dans le cancer folliculaire de la thyroïde, Klotho réduit l'expression de la stanniocalcine 1 (STC1), une glycoprotéine sécrétée et impliquée dans la régulation des phosphates et du calcium, mais également considérée comme un proto-oncogène impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses thyroïdiennes [261]. Klotho étant décrite comme régulant l'expression des deux stanniocalcines 1 et 2 [273], il sera donc intéressant d'étudier les effets de Klotho sur leurs rôles pro- ou anti-tumoraux dans d'autres modèles.

Enfin, certains rôles pro-oncogènes de Klotho ont été décrits. D'une part, dans les hépatomes, Klotho favoriserait la migration et la résistance à l'anoïkis induite par VEGFR2/PAK1, concordant ainsi avec le mauvais pronostic associé à une forte expression de *KL* dans cette pathologie [249]. D'autre part, dans le cancer de la prostate où 90% des tumeurs métastatiques expriment *KL*, Klotho participe à la transduction du signal de FGF19 dont la surexpression favorise la prolifération, l'invasion et l'adhérence des cellules cancéreuses [248].

Dans la lignée non cancéreuse, l'effet du FGF19 est limité, probablement à cause d'un système inhibiteur bridant sa signalisation.

En revanche, elle inhibe bFGF *via* la réduction de p-ERK1/2 dans les cancers mammaire [244] et pancréatique [137], suggérant que ses effets pourraient être dépendants à la fois du contexte cellulaire, de l'abondance des FGFs dans le microenvironnement, ainsi que de la présence de βKlotho, exprimée dans le tissu tumoral mais pas le pancréas sain [248].

Enfin, la signification de la corrélation entre le taux sérique de Klotho et la progression des tumeurs ovariennes reste à élucider [250]. Il se pourrait que le rôle stimulateur de Klotho dans l'angiogenèse [221,274] soit impliqué ici, et peut-être aussi dans les métastases de la prostate [248]. Cependant aucune donnée actuelle ne permet d'y répondre. De plus, d'autres travaux sur le cancer de l'ovaire montrent un rôle suppresseur de tumeur de Klotho par l'inhibition des marqueurs mésenchymateux, de la voie IGF-1 et de l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes [245].

Klotho est une protéine de longévité qui, par son action intracellulaire et extracellulaire, grâce à sa forme membranaire et à ses multiples produits solubles, agit dans de nombreux tissus et régule des voies de signalisation non seulement impliquées dans le vieillissement, mais également à l'origine de pathologies, dont le cancer. En effet, Klotho agit au carrefour des ROS, de l'inflammation, de la sénescence, de l'angiogenèse, de la différenciation, de l'EMT, etc. en modulant des voies telles qu'IGF-1, FGF, Wnt et TGFβ, les canaux ioniques et les motifs de glycosylation à la surface des cellules (Figure 24).

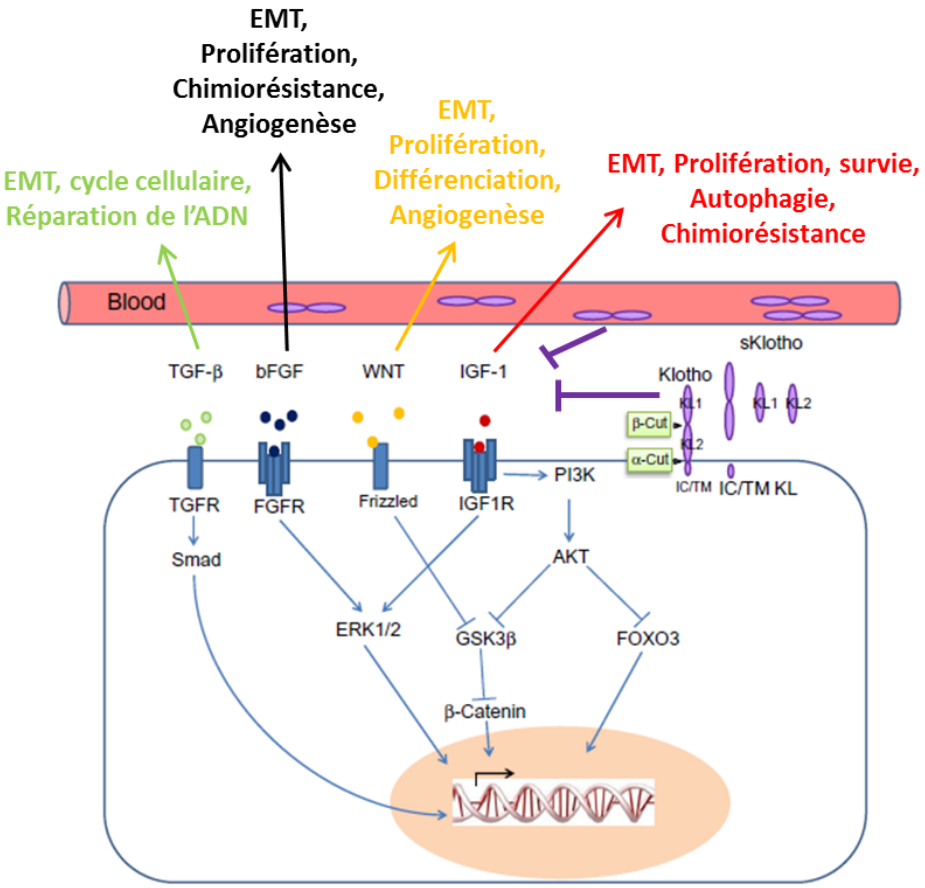


Figure 24 *Klotho exerce un rôle suppresseur de tumeur en inhibant les voies des facteurs de croissance impliquées dans des processus oncogéniques. (adapté de Rubinek et Wolf, Vitamins and Hormones, 2016)*

Son potentiel dans le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre le cancer semble vaste. La majorité des études se sont concentrées sur IGF-1 et Wnt, mais d'autres pistes concernant son influence sur le microenvironnement tumoral ou encore le remodelage de la signalisation calcique dans la cellule tumorale présentent un intérêt majeur. Au cours de ce projet, je me suis particulièrement intéressée à l'impact que pouvait avoir Klotho sur l'homéostasie calcique de la cellule cancéreuse, car le Ca^{2+} est un messager impliqué dans les phénotypes tumorigéniques.

Chapitre 3 : Le calcium, un messager ubiquitaire dont la signalisation est altérée dans la cellule tumorale

Dans le laboratoire, notre équipe s'intéresse au rôle du calcium (Ca^{2+}) dans la signalisation de la cellule tumorale et plus particulièrement à son implication dans les mécanismes de migration et de chimiorésistance. En effet, depuis de nombreuses années déjà, les données s'accumulent concernant le remodelage de la signalisation calcique dans la cellule cancéreuse et son impact sur les différents phénotypes tumorigéniques ou sur le pronostic des patients.

Etant donné le rôle de Klotho dans l'homéostasie calcique et dans la régulation des canaux calciques des cellules saines, je me suis intéressée au cours de ce projet de thèse à l'effet qu'elle pouvait avoir sur la signalisation calcique de la cellule tumorale et ses conséquences sur la chimiorésistance.

Cette troisième partie a donc pour objectif de présenter le rôle général du Ca^{2+} dans l'organisme et la cellule, les principaux acteurs moléculaires qui participent à l'homéostasie calcique (le calciosome), et enfin les dérégulations que l'on peut constater dans les cellules néoplasiques.

I. Dans la cellule saine, le calcium est un messager finement contrôlé

Le Ca^{2+} est un ion majeur dans la physiologie animale. Il possède d'une part un rôle structural, car participe à la formation du tissu osseux, mais remplit également de nombreuses fonctions à l'état d'ion libre ou lié aux biomolécules. Le Ca^{2+} provient des os, qui stockent 99% du Ca^{2+} de l'organisme et peuvent en libérer sous l'action de la PTH (parathormone), ainsi que de l'alimentation d'où il est absorbé par l'intestin. Son excrétion, quant à elle, est réalisée par les reins. Ces mécanismes sont finement régulés par la protéine Klotho, entre autres, afin de maintenir une concentration plasmatique de Ca^{2+} autour de 100mg/L (2,5mM) et d'éviter la précipitation du Ca^{2+} avec les phosphates.

Dans l'organisme, le Ca^{2+} participe à la coagulation du sang, l'influx nerveux, la contraction musculaire, la motilité des spermatozoïdes et des cellules immunitaires, l'activation de l'ovocyte lors de la fertilisation… Au niveau cellulaire, il est impliqué dans tous les processus cruciaux tels que la prolifération, la migration, la différenciation, le transport

vésiculaire, l'adhésion et la mort [275,276]. Toutes ces fonctions sont rendues possibles grâce à la génération de signaux calciques au sein de la cellule ou même du tissu.

Pour cela, un gradient électrochimique est maintenu : la Ca^{2+} est 20 000 fois moins concentré dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt} \approx 100nM$) que dans le milieu extracellulaire ($[Ca^{2+}]_{ext} \approx 2mM$). Ceci est réalisé grâce à la chélation, l'extrusion et la compartimentalisation du Ca^{2+} au sein de la cellule [277].

1) Le maintien du gradient électrochimique du Ca^{2+}

a) La chélation des ions Ca^{2+}

Afin de réduire le nombre d'ions Ca^{2+} libres, des senseurs et adaptateurs protéiques chélatent le Ca^{2+}. On distingue principalement deux grands types de domaines permettant de lier le Ca^{2+} et partagés par des centaines de protéines :

- Le **domaine « EF hand »**, formé par deux hélices α reliées par une boucle d'acides aminés. La fixation du Ca^{2+} entraîne un changement de conformation de la protéine qui lui permet d'interagir avec des partenaires cibles et/ou lève l'inhibition d'un site catalytique.
- Le **domaine C2** : constitué de 8 feuillets-β antiparallèles, il lie 2 à 3 ions Ca^{2+} et permet le recrutement de la protéine à la membrane.

Le domaine « EF-hand » est retrouvé notamment dans la calmoduline. Cette protéine cytosolique a été fortement conservée au cours des 1,5 milliards d'années d'évolution et est transcrite par trois chromosomes chez l'humain [277] : ceci illustre bien son importance biologique. Une fois liée au Ca^{2+}, sa conformation évolue et lui permet de recruter de nombreuses protéines cibles parmi lesquelles la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*), qui régule la contraction de la cellule musculaire, ainsi que la CaMKII (*CalModulin-Kinase II*). La fixation de la calmoduline lève l'auto-inhibition du site catalytique de la CaMKII, qui participe à de nombreuses cascades de signalisation. Le domaine « EF hand » est également présent dans les protéines S100 qui participent à l'assemblage/au désassemblage de complexes protéiques comme les microtubules. Enfin, il est aussi retrouvé dans le senseur réticulaire STIM (*Stromal Interaction Molecule*), nécessaire à l'activation de l'entrée capacitive de Ca^{2+}.

Le domaine C2, en fixant le Ca^{2+}, crée un potentiel électrostatique qui favorise l'association de la protéine avec les feuillets anioniques, c'est-à-dire la face cytosolique de la membrane plasmique ou encore la face externe de la membrane externe mitochondriale. Il

permet le recrutement à la membrane plasmique de protéines telles que PKC (*Protein Kinase C*), PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), ou encore PLC (*Phospholipase C*).

Dans le réticulum endoplasmique (RE), la concentration de Ca^{2+} est comprise entre 0,5 et 1mM environ, faisant de ce compartiment la principale réserve de Ca^{2+} intracellulaire. Des protéines luminales chélatent le Ca^{2+} afin de réduire le nombre d'ions libres [278] :

- La **calréticuline,** une protéine chaperonne qui tamponne près de 50% du Ca^{2+} réticulaire
- **BiP** (*Immunoglobulin Binding Protein,* aussi appelée GRP78), une chaperonne qui tamponne 25% du Ca^{2+} luminal et régule également les acteurs de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) activée lors du stress su RE
- **GRP94** (*Glucose Related Protein 94kDa*), une chaperonne des protéines sécrétées et membranaires
- **PDI** (*Protein Disulfide Isomerase*), qui réalise aussi les ponts disulfures (liaisons S-S) entre les chaînes polypeptidiques
- **ERp72**, une chaperonne capable de lier le Ca^{2+}

Dans le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires, la calséquestrine est la principale protéine chélatrice de Ca^{2+}. L'appareil de Golgi, les peroxysomes, le lysosome et l'enveloppe nucléaire stockent également du Ca^{2+} mais leur réserve est négligeable en comparaison de celle du RE.

Dans la matrice mitochondriale, le Ca^{2+} n'est pas lié à des protéines chélatrices mais précipité sous forme de $CaPO_4$.

b) L'extrusion du Ca^{2+}

Sous l'effet d'une stimulation induisant une élévation de la concentration calcique cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), cette dernière peut monter jusqu'à 2µM. Le retour à une $[Ca^{2+}]_{cyt}$ autour de 100nM nécessite donc le transport de Ca^{2+} hors de la cellule. A la membrane plasmique, cette fonction est assurée par l'ATP-ase PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*), qui pour une molécule d'ATP extrude un ion Ca^{2+}, ainsi que par deux échangeurs : Na^+/ Ca^{2+} (NCX) qui expulse un ion Ca^{2+} contre l'influx d'un ion Na^+, et l'échangeur Na^+/ Ca^{2+}- K^+ (NCKX), qui échange un ion Ca^{2+} et un ion K^+ contre 4 ions Na^+. Les échangeurs permettent les réajustements rapides, par exemple après un potentiel d'action dans le neurone [279], tandis que la pompe PMCA permet de réduire de façon durable la $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

c) La compartimentalisation du Ca^{2+}

Bien que l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxysomes et l'enveloppe nucléaire puissent stocker puis libérer une partie du Ca^{2+} intracellulaire, la majeure partie des réserves de Ca^{2+} se trouve dans le RE. Pour cela, le Ca^{2+} est pompé par les Ca^{2+}-ATP-ases SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase*) avec un meilleur rendement que les pompes PMCA : pour une molécule d'ATP, deux ions Ca^{2+} entrent dans le RE.

La mitochondrie assure un rôle prépondérant de « tampon » du Ca^{2+} cytosolique. L'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie se fait par le canal VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), puis c'est le MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*) qui le fait rentrer dans la matrice mitochondriale grâce aux différences de potentiel, créées par la force proton-motrice générée par la chaîne respiratoire.

Les différents mécanismes du maintien du gradient électrochimique du Ca^{2+} dans la cellule sont résumés dans la Figure 25.

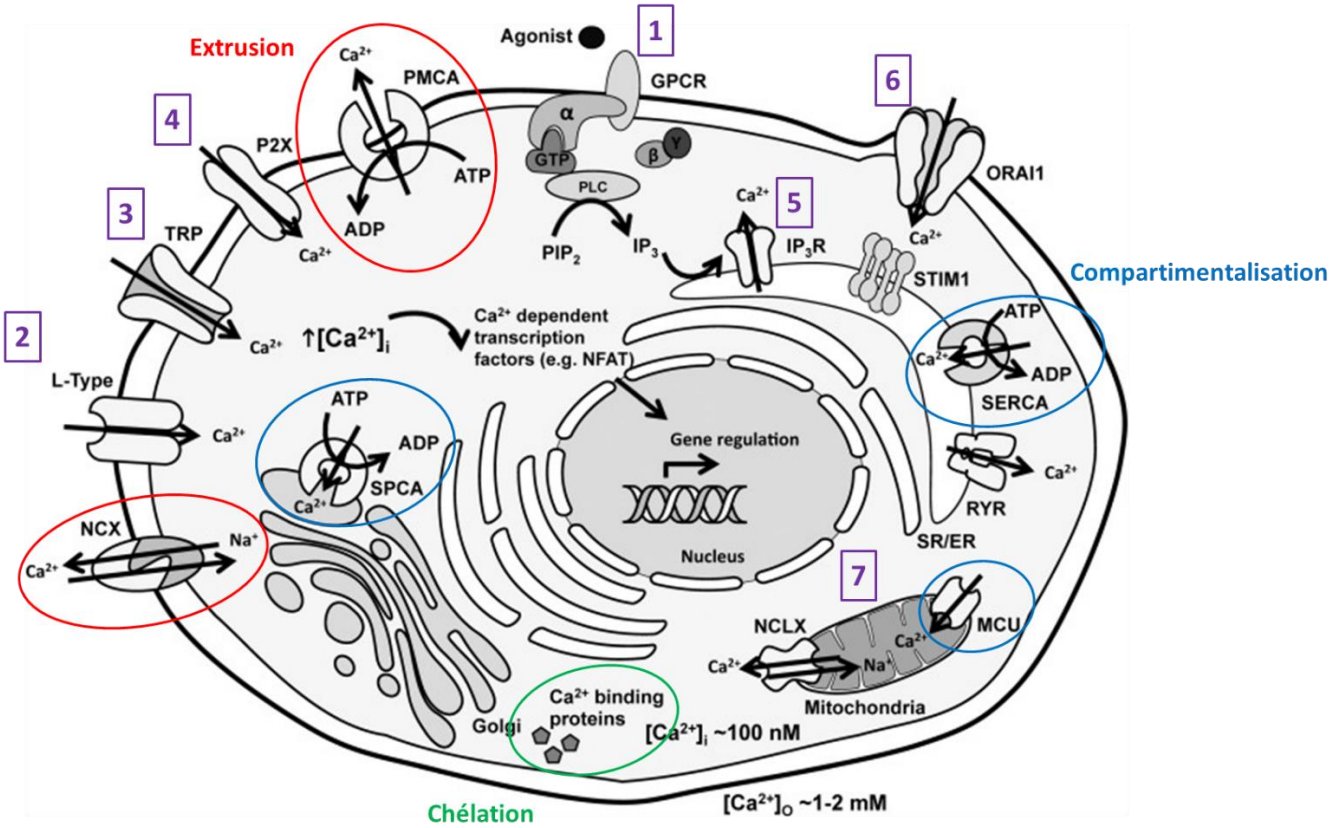


Figure 25 *Vue d'ensemble des mécanismes de chélation (vert), d'extrusion (rouge) et de compartimentalisation (bleu) du Ca^{2+}, permettant son influx par les canaux de la membrane (1, 2, 3, 4, 6) et sa libération par le RE (5) et les mitochondries (7) (adapté de Stewart et al, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2015)*

La préservation de ce gradient permet la génération de signaux calciques au sein de la cellule, qui participent à la signalisation intracellulaire mais également intercellulaire, par la circulation dans le milieu de messagers stimulant l'influx de Ca^{2+} (1) (Figure 25). Le signal calcique cytosolique provient principalement de canaux voltage-dépendants (2), de canaux TRP (3), de canaux ROC (4), de la libération de Ca^{2+} par le RE (5), associée à une entrée capacitive par les canaux SOC (6), ou par les mitochondries (7).

2) Mécanismes à l'origine des signaux calciques cytosoliques

a) Les communications intercellulaires

Des vagues calciques peuvent se propager au sein d'un tissu comme l'épithélium [280] ou les cellules musculaires lisses [281] afin de synchroniser leur activité [275], grâce aux communications intercellulaires.

Il peut s'agir de jonctions GAP entre les cellules, qui sont des complexes constitués de connexines. Elles permettent la liaison directe des cytoplasmes de deux cellules et donc la circulation d'IP3 par exemple, qui entraîne la libération de Ca^{2+} par le RE [282].

Les vagues peuvent également se propager dans le tissu grâce à la libération simultanée d'ATP dans le milieu extracellulaire, qui va stimuler dans la cellule voisine, par une communication de type paracrine, l'ouverture des canaux formés par les pannexines et l'influx de Ca^{2+} [283].

La communication intercellulaire comprend aussi les récepteurs ionotropes, c'est-à-dire des récepteurs-canaux (canaux ROC, *Receptor-Operated Channel*), dont l'ouverture est activée par un messager chimique, tels que les récepteurs NMDA (glutamate), nicotiniques (acétylcholine), purinergiques (ATP)… Ils sont activés par la libération par exocytose de messagers dans le milieu extracellulaire (exemple : synapse) et induisent une entrée de Ca^{2+} dans la cellule.

Enfin, les canaux SMOC (*Second Messenger-Operated Channel*) sont activés par un intermédiaire produit par l'activation d'un récepteur membranaire. Par exemple, le récepteur muscarinique M1 de l'acétylcholine induit la formation de DAG (DiAcylGlycérol) par la PLC, qui peut alors activer un canal TRP (*Transient Receptor Potential*).

b) Les canaux voltage-dépendants (VOC)

Dans les cellules excitables (muscle, système nerveux, glande), les canaux voltage-dépendants permettent de coupler la stimulation électrique (potentiel d'action) à une réponse physiologique (contraction, sécrétion d'hormone, transmission synaptique) [284]. Ils sont sélectifs du Ca^{2+} en sa présence et leur ouverture est dépendante du potentiel membranaire, et plus précisément d'un seuil atteint lors de la dépolarisation de la membrane plasmique. Ils sont donc appelés VOC : *Voltage-Operated Ca^{2+}-Channels*. Ils permettent des changements rapides et importants de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, laissant passer 10^6 ions Ca^{2+} par seconde [277]. Ils sont classés en différentes catégories, selon leurs caractéristiques électrophysiologiques, moléculaires et pharmacologiques.

Bien que ces canaux soient emblématiques des cellules excitables, ils sont également exprimés dans d'autres modèles comme les lymphocytes T [285]. Cependant, étant moins étudiés, leur rôle dans les cellules « non excitables » est moins décrit.

c) Les canaux TRP

L'ensemble des canaux TRP se divise en plusieurs sous-familles [286] : les TRPC (Canonique), TRPV (Vanilloïde), TRPM (Mélastatine), TRPP (Polycystine), TRPML (Mucolipine), TRPN et TRPA1 (Ankryne). Les canaux TRP sont organisés sous forme de tétramères, une sous-unité étant constituée de six domaines transmembranaires. Le pore du canal se trouve entre les domaines 5 et 6. Différentes sous-unités peuvent s'hétérodimériser pour former le canal. Les répétitions ankyrines et le domaine coiled-coil de la partie N-terminale sont essentiels à leur assemblage (**Figure 26**).

Les stimuli entraînant leur ouverture peuvent être chimiques ou encore physiques (lumière, étirement, chaleur…). Ces canaux sont donc des senseurs physiologiques essentiels de nombreux facteurs environnementaux. Ils ne sont pas sélectifs du Ca^{2+} (sauf TRPV5 et TRPV6), le Na^+ participe également à la dépolarisation de la cellule lors du l'ouverture d'un canal TRP.

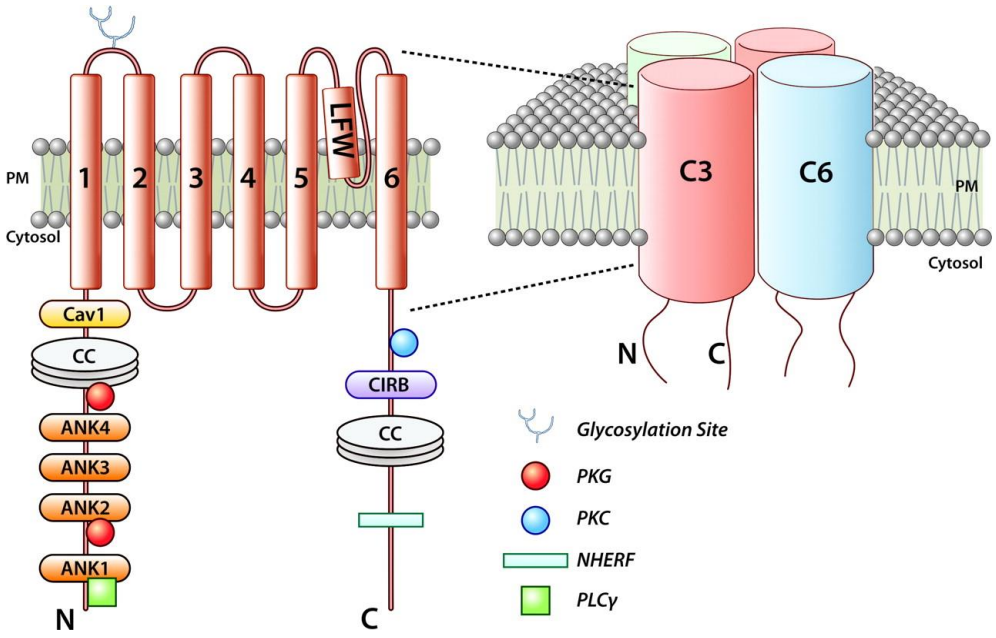


Figure 26 *Structure d'un tétramère TRPC3/C6 et des sous-unités qui le composent. (extrait de Eder et Molkentin, Circulation Research, 2011)*

Au cours de ce projet, je me suis plus particulièrement intéressée à TRPC6, dont l'exocytose induite par la PI3K est inhibée par Klotho. TRPC6 est principalement exprimé dans les poumons, le placenta, le cerveau et les podocytes des reins [287]. Chez la souris, son expression est détectée dans les pré-adipocytes mais ce canal n'est plus présent dans les adipocytes matures [288]. Une mutation de TRPC6 causant une augmentation de son activité est à l'origine de la glomérulosclérose segmentaire et focale [289]. Les reins des patients qui en sont atteints ne réabsorbent plus correctement les protéines qui sont éliminées avec les urines et ils développeront avec les années une insuffisance rénale chronique. En limitant la présence de TRPC6 à la membrane plasmique, Klotho protège donc des lésions causées par une activité excessive de TRPC6 [290].

TRPC6 est stimulé par le DAG produit par l'hydrolyse du PIP2 (PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate) par la PLC, elle-même activée par un récepteur à activité tyrosine-kinase (RTK) ou couplé aux protéines G. Parallèlement, le DAG active la PKC qui va inhiber TRPC6 [291], exerçant ainsi un rétrocontrôle pour limiter son activité.

En outre, la partie C-terminale de TRPC6 interagit avec le PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), ce qui casse sa liaison avec la calmoduline [292]. Or, cette dernière intervenant dans la désensibilisation des canaux TRP, l'interaction de TRPC6 avec le PIP3 augmente le courant généré par l'ouverture du canal. Toutefois, la régulation de TRPC6 par la calmoduline est plus complexe, car la phosphorylation du canal par la CaMKII semble être

indispensable à son activité [293]. TRPC6 peut également être phosphorylé par une kinase src [294], couplée à un RTK, ainsi que par la PKA [295] ou la PKG activée par le NO [296].

Par ailleurs, TRPC6 possède deux sites N-glycosylés, dont la mutation entraîne une activité constitutive du canal [297].

Un autre type de régulation de TRPC6 est exercé par le senseur réticulaire STIM1 [298]. Ce dernier favorise l'hétérodimérisation entre TRPC1 et TRPC3, au détriment de leur association avec TRPC6. En résulte une diminution de la translocation de TRPC6 à la membrane plasmique. Maintenu au RE, TRPC6 participerait à la fuite passive de Ca^{2+}.

Enfin, les ROS modulent l'expression et l'activité de TRPC6, toutefois les mécanismes exacts sont encore inconnus et leurs effets semblent dépendants du contexte cellulaire [299].

L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 est important dans le système nerveux pour l'activation de ERK et de CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*) induite par le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), favorisant le développement dendritique et la synaptogenèse [300].

Dans les cardiomyocytes, l'Angiotensine II active la production de DAG par la PLC. L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 active alors la calcineurine, qui induit la transcription de gènes impliqués dans l'hypertrophie par l'intermédiaire du facteur de transcription NFAT [301] (**Figure 27**).

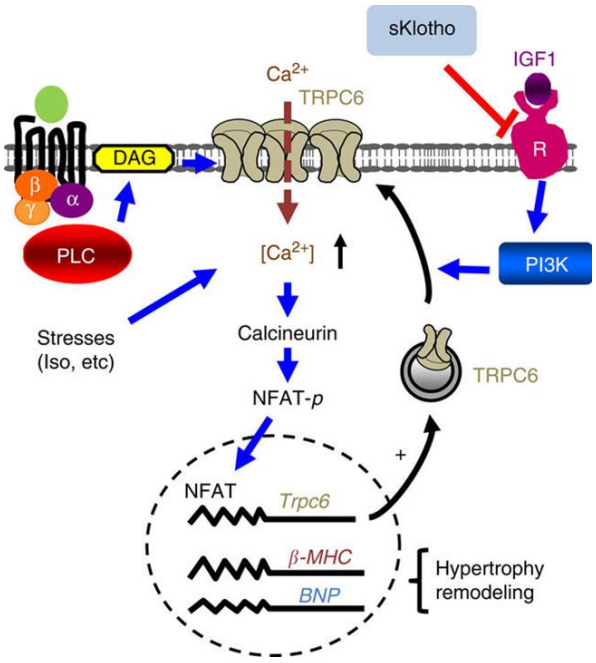


Figure 27 *Régulation de l'activité de TRPC6 et de sa présence à sa membrane dans les cardiomyocytes de rat (extrait de Xie et al, Nat Commun, 2012)*

Enfin dans les fibroblastes, l'influx de Ca^{2+} par TRPC6 active RhoA qui réduit la migration cellulaire [302]. Le rôle de TRPC6 dépend donc du contexte cellulaire et des partenaires impliqués.

d) Libération de Ca^{2+} par le RE

- *Les récepteurs à l'IP3, les récepteurs à la ryanodine… et les TRPs*

La libération stimulée de Ca^{2+} par le RE fait intervenir les récepteurs à l'IP3 (IP3R) [276]. Il en existe trois isoformes, exprimées différentiellement selon les tissus. Ces canaux possèdent des domaines de fixation au Ca^{2+} et à l'IP3, produit soit par la PLCβ activée par un récepteur couplé aux protéines G, soit par la PLCγ activée par un récepteur à activité tyrosine-kinase. La fixation de l'IP3 stimule l'ouverture du canal. Une fois ouvert, la probabilité d'ouverture du canal en fonction de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ suit une courbe en cloche : à faible concentration le Ca^{2+} favorise l'ouverture du canal, il est alors co-activateur, en revanche à forte concentration il l'inhibe. L'ouverture des IP3R peut entraîner une $[Ca^{2+}]_{cyt}$ = 1µM pendant plusieurs secondes.

Les IP3R peuvent être régulés par de nombreuses kinases telles que PKA, PKG, PKC, CaMKII, src, CDK1, ERK… illustrant leur importance au carrefour de multiples processus cellulaires. En outre, les membres de la famille Bcl-2 régulent également leur probabilité d'ouverture au niveau des zones d'association du RE avec les mitochondries : Bcl-2 grâce à son domaine BH4 et Bcl-xL en interagissant avec son domaine BH3. De concert, Bcl-2 et Bcl-xL favorisent les signaux sous forme d'oscillations de faible amplitude, qui stimulent le métabolisme mitochondrial, et répriment les signaux pro-apoptotiques de forte amplitude [272].

Les récepteurs à la ryanodine (RyR), qui comptent également trois isoformes, sont des canaux dont l'ouverture est stimulée par le Ca^{2+}, avec un profil de sensibilisation en cloche comme les IP3R [303]. Dans le muscle squelettique, ils participent au couplage de l'excitation à la contraction. Dans le cerveau, ils sont impliqués dans la libération des neurotransmetteurs. Ils interviennent aussi dans le CICR (*Ca^{2+}induced-Ca^{2+} release*), c'est-à-dire que lorsque la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ augmente à proximité d'un RyR, il libère lui-même du Ca^{2+} réticulaire. Il est ensuite inactivé par la fixation de la calmoduline liée au Ca^{2+}.

Les IP3R comme les RyR sont sensibles au statut redox de la cellule, ainsi qu'à la présence de NO et de ROS.

D'autres canaux ont été décrits comme pouvant libérer le Ca^{2+} réticulaire. Le canal Polycystin 2 de la famille TRP et localisé au RE est sensible à la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ [304]. De même, TRPV1 [305] et TRPM8 [306] fonctionnent également comme des récepteurs canaux lorsqu'ils sont localisés au RE.

- *La fuite passive du Ca^{2+}*

La fuite passive du Ca^{2+} réticulaire est un phénomène physiologique dont les acteurs sont encore mal connus et dont les conséquences sont certainement encore sous-estimées. Ce phénomène est notamment compensé par l'activité des pompes SERCA.

L'acteur majeur de la fuite du Ca^{2+} réticulaire semble être le complexe ribosome-translocon [307]. En effet, le translocon est un important complexe protéique impliqué dans la translocation du polypeptide en cours d'élongation dans la lumière du RE, afin qu'il puisse entamer le processus de maturation. Lorsque la chaîne polypeptidique est libérée, le pore du canal formé par l'hétérotrimère Sec61 est perméable au Ca^{2+}. Cette conformation peut être figée par un antibiotique, la puromycine. En revanche, un autre inhibiteur de la synthèse protéique, l'anisomycine, bloque le translocon sans que le polypeptide ne soit relâché : le translocon reste donc dans une conformation ne laissant pas sortir le Ca^{2+} du RE. Les mécanismes de régulation du translocon sont encore peu connus, mais la protéine chaperonne BiP, chélatrice du Ca^{2+} et régulatrice de l'UPR, réduit la perméabilité du translocon au Ca^{2+} en liant Sec61α et en faisant obstruction à la sortie de Ca^{2+} au niveau du pore du canal [308] (**Figure 28**).

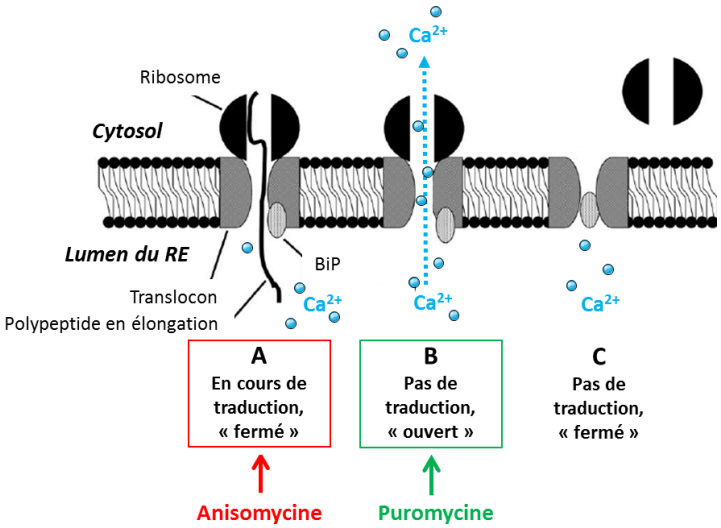


Figure 28 *La perméabilité du translocon au Ca^{2+} est contrecarrée par le polypeptide en cours d'élongation et la protéine chaperonne BiP. L'anisomycine et la puromycine figent le translocon dans les états A et B, respectivement. En absence de ribosome, le translocon est imperméable au Ca^{2+} (état C dit « fermé »). (adapté de Lizák et al, Mol Membr Biol, 2008)*

Il a également été démontré que la caspase 3 était capable de cliver IP3R1 et que ce fragment se comportait comme un canal de fuite [309].

Les pannexines, décrites précédemment dans la communication intercellulaire, peuvent également être localisées au RE. Ainsi, Panx1 participerait à la fuite du Ca^{2+} réticulaire [310].

La famille des protéines TMBIM (*TransMembrane Bax Inhibitor Motif containing protein*), comprend six membres possédant un motif senseur du pH très conservé durant l'évolution [311]. Cette famille régule notamment la mort cellulaire [312]. TMBIM 1-3 sont principalement localisés dans l'appareil de Golgi mais sont également présents au RE, tandis que TMBIM 4-6 sont majoritairement réticulaires, bien que l'on retrouve aussi TMBIM5 à la mitochondrie. Le canal le plus connu de cette famille est *Bax-Inhibitor 1* (BI-1, ou TMBIM6), qui agirait comme un canal de fuite du Ca^{2+} réticulaire [313], réduisant le contenu du RE et la libération de Ca^{2+} induite par la thapsigargine. Sa perméabilité au Ca^{2+} est modulée par le pH [311]. Le rôle des autres membres de la famille en tant que canaux de fuite du Ca^{2+}, bien que suspecté, reste cependant à être démontré.

Enfin, comme présenté plus haut, TRPC6 localisé au RE agit comme un canal de fuite sans pour autant modifier le contenu réticulaire calcique [298]. Le canal TRPP2 (polycystin-2) est également décrit comme un canal de fuite passive du Ca^{2+} au RE [314].

e) Canaux activés par la déplétion des stocks de Ca^{2+} réticulaire (SOC)

L'ouverture de l'IP3R induite par l'activation d'un récepteur engendre une diminution de la concentration calcique réticulaire $[Ca^{2+}]_{RE}$. La protéine STIM1, déjà évoquée comme senseur de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ par ses domaines « EF hand », s'oligomérise et se relocalise aux zones d'apposition entre la membrane réticulaire et la membrane plasmique. Elle va alors activer les canaux CRAC (Ca^{2+}-Release Activated Channel), sélectifs du Ca^{2+} et à faible conductance, dont Orai1 est le principal composant [315]. Orai2 et Orai3 existent aussi, mais les courants qu'ils engendrent sont plus faibles et leur coopération avec STIM1 est moins forte. L'influx de Ca^{2+} par Orai1 est aussi appelé entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC) ou SOCE (*Store-Operated Ca^{2+} Entry*) et n'est pas dépendant de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, contrairement aux canaux TRP qui, de plus, ne sont généralement pas sélectifs du Ca^{2+}.

Plusieurs études montrent que les TRPC, en particulier, peuvent participer à l'ECC en s'associant avec Orai1 et STIM1 [316]. Toutefois, ils ne font pas partie des canaux CRAC à

proprement dit car le courant qu'ils génèrent n'en possède pas les caractéristiques et leur désignation comme membres des SOC fait encore débat. Parmi les canaux SOC potentiels figurent TRPC1-4-5-6-7 et TRPV6.

L'ECC a longtemps été considérée comme un mécanisme de remplissage du RE suite à la déplétion des stocks intracellulaires. Cependant, les mitochondries, présentes dans les régions d'association entre STIM1 et Orai1, absorbent la majorité de l'influx calcique, remettant ainsi en cause l'importance du rôle de l'ECC dans le remplissage du RE [277].

L'ECC est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la migration, etc., mais notre laboratoire a également démontré qu'elle exerçait un rétrocontrôle négatif sur la signalisation de la voie extrinsèque de l'apoptose induite par le récepteur à domaine de mort CD95 (*Cluster of Differentiation 95*, aussi appelé Fas) dans les lymphocytes T [317]. L'ECC retarde la formation et l'activation du complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) *via* le recrutement de la PKCβ2 induit par l'influx de Ca^{2+} par Orai1 (**Figure 29**).

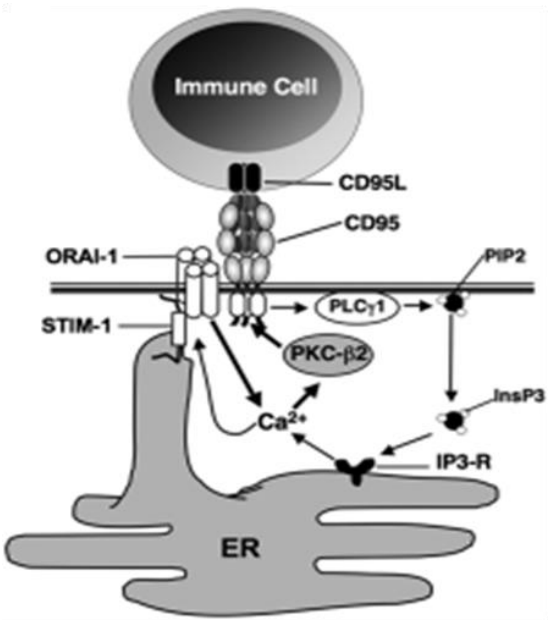


Figure 29 *L'influx de Ca^{2+} par Orai1 recrute la PKC au complexe initié par CD95 et retarde l'activation des caspases faisant partie du DISC (extrait de Khadra et al, PNAS, 2011)*

Le laboratoire a également montré que l'inhibition de l'influx de Ca^{2+} par Orai1 améliorait la réponse apoptotique au Rituximab, un anticorps anti-CD20, qui constitue le traitement de référence des lymphomes B [318].

f) Libération de Ca^{2+} par les mitochondries

La sortie du Ca^{2+} hors des mitochondries se fait grâce à un échangeur de protons MHCX. Mais la libération la plus importante du Ca^{2+} mitochondrial est effectuée par le PTP (*Permeability Transition Pore*), dont l'ouverture est stimulée lors d'un stress important de la cellule. L'ouverture du PTP entraîne une sortie massive du Ca^{2+} vers le cytosol, une dissipation du potentiel mitochondrial ainsi que la libération du cytochrome c, qui forme alors l'apoptosome avec la caspase 9 activée, déclenchant la voie intrinsèque de l'apoptose.

L'origine des signaux calciques cytosoliques est très importante pour la nature des voies de signalisation et des phénotypes régulés par le Ca^{2+}. Elle participe à la signature calcique, c'est-à-dire à la carte d'identité du signal calcique, qui détermine les effets qu'aura l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

3) Le signal calcique est codé en amplitude, dans le temps et dans l'espace

Les conséquences de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ peuvent être complexes car le signal calcique s'interprète à la fois en fonction de son amplitude, de son profil (oscillations ou large augmentation), de sa fréquence mais également de sa localisation. Tous ces paramètres constituent la signature calcique.

a) Blip, puff et vague calcique

Le signal calcique peut prendre plusieurs formes, selon les acteurs qui le génèrent et leur organisation dans l'espace. Un modèle a ainsi été proposé pour la libération de Ca^{2+} par les IP3R avec (**Figure 30**) :

- Le **blip** : c'est le résultat de l'ouverture d'un seul canal IP3R par une faible quantité d'IP3
- Le **puff** : c'est la conséquence de l'activation de plusieurs IP3R organisés en cluster
- La **vague calcique (wave)** : elle se propage du fait de l'activation séquentielle de clusters d'IP3R, se déplaçant de 10 à 50µm/s

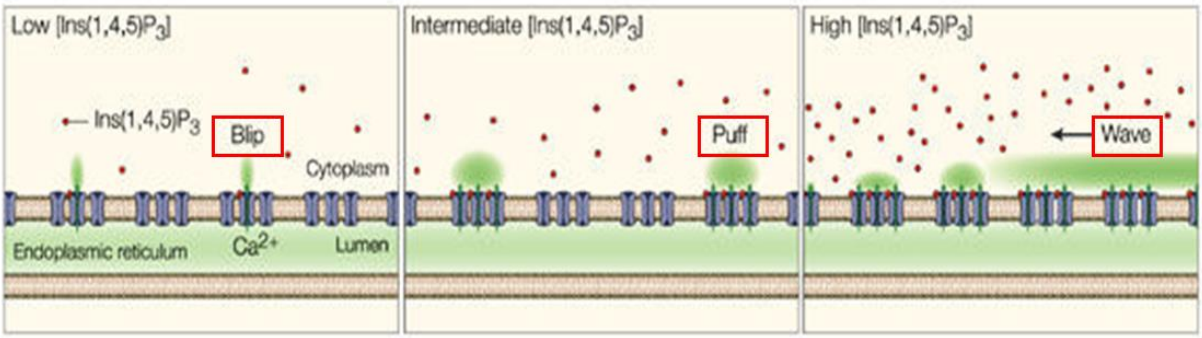


Figure 30 *Blip, puff et vague calcique (wave) générés par l'IP3R en fonction de la quantité d'IP3 cytosolique à proximité (adapté de LaFerla, Nature Reviews Neuroscience, 2002)*

Comme évoqué précédemment, il peut aussi y avoir des vagues intercellulaires. Les blips et puffs vont permettre l'activation très localisée de protéines tandis que les vagues intracellulaires et intercellulaires vont permettre des réponses cellulaires plus massives, voire la synchronisation d'un tissu pour une fonction physiologique (contraction, sécrétion…).

b) Contrôle spatio-temporel du signal calcique

Outre l'importance du signal généré, le Ca^{2+} libéré dans le cytosol est également contrôlé à la fois dans l'espace et dans le temps par les protéines-tampons qui le chélatent, par les protéines mobiles qu'il active, ainsi que par les mitochondries qui l'absorbent. Le Ca^{2+} n'agit que localement mais le relai de son signal dans l'espace et le temps peut par exemple prendre la forme d'enzymes cytosoliques (CaMKII, calpain…), d'enzymes mitochondriales (les déshydrogénases du cycle de Krebs sont stimulées par le Ca^{2+}), d'endonucléases nucléaires, d'histone-désacétylases ou enfin de facteurs de transcription activés par le Ca^{2+} (expl : NFAT, NFκB…), qui vont alors être transférés au noyau pour modifier la transcription des gènes (**Figure 31**).

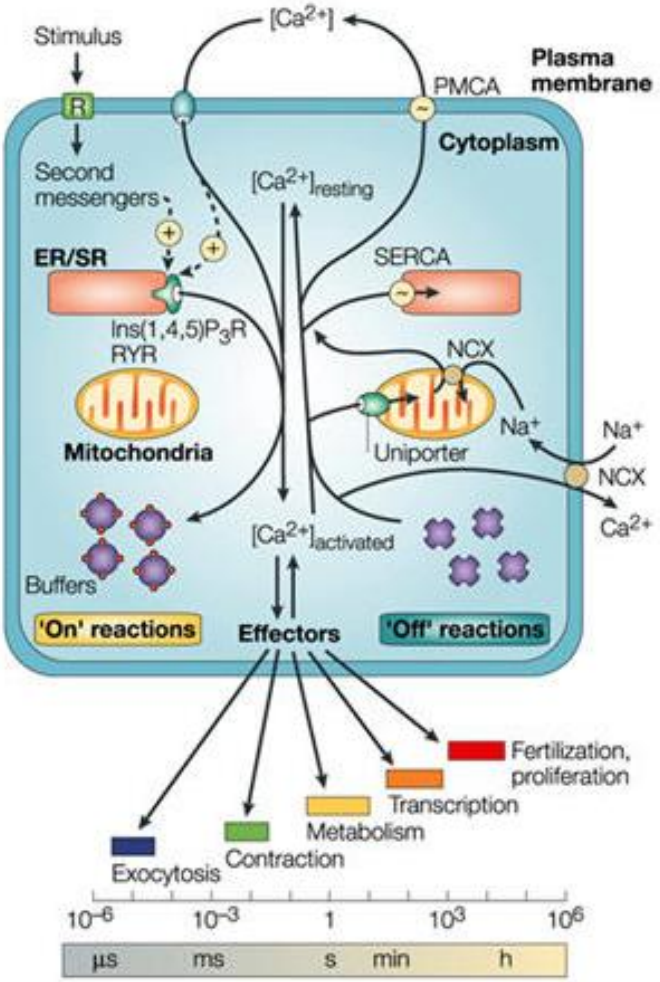


Figure 31 *A l'état basal, le Ca^{2+} est expulsé par la PMCA et compartimentalisé par la SERCA et les mitochondries. Lorsqu'un signal calcique est généré, sa signature permet d'activer des réponses rapides comme l'exocytose en quelques microsecondes ou des processus plus longs (en heures) comme la transcription des gènes et la prolifération cellulaire (extrait de Berridge et al, Nature Reviews Molecular Cell BIology, 2003)*

La voie des MAPK est aussi un exemple de voie activée par le Ca^{2+} qui le traduit en signalisation intracellulaire. En effet, en produisant du DAG, la PLC permet le recrutement de la PKC. Parallèlement, l'IP3 active son récepteur et la libération de Ca^{2+} active RasGRF, qui lui-même stimule RasGRP. La coopération de la PKC et de RasGRP active alors Ras/Raf1, à l'origine de l'activation en cascade des kinases.

Du codage du signal en amplitude, dans l'espace et dans le temps résulte la spécificité de la réponse cellulaire : ainsi, les facteurs de transcription NFκB et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) sont activés par une forte augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, tandis que NFAT est activé par une élévation plus faible de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ qui se maintient (plateau du signal) [319]. La fréquence des oscillations calciques est également importante pour l'activation de certaines protéines, par exemple la CaMKII, ainsi que le fonctionnement des mitochondries.

En effet, le Ca^{2+} ne reste libre que très peu de temps, il est soit chélaté, soit extrudé, soit repompé. Les mitochondries assurent un rôle essentiel dans le tamponnage du Ca^{2+} cytosolique. D'une part, leur production d'ATP est favorisée par les oscillations du Ca^{2+} matriciel et d'autre part, ce sont les sentinelles de la surcharge calcique, en conséquence de laquelle le PTP s'ouvre pour induire la voie intrinsèque de l'apoptose. Ceci souligne l'importance du réseau entretenu entre le RE et les mitochondries et en particulier les structures appelées MAMs (*Mitochondrial Associated Membranes*), qui sont des régions d'association entre les membranes réticulaires et mitochondriales [320]. Les MAMs regroupent de nombreuses protéines (**Figure 32**) :

- La **mitofusine 2**, une dynamine impliquée dans la fusion mitochondriale
- **BiP**, la protéine chaperonne qui peut être transloquée à la mitochondrie lors d'un stress réticulaire. BiP réduit le flux calcique entre le RE et la mitochondrie, augmente la capacité d'absorption de la mitochondrie. Elle inhibe la formation de ROS et la perte du potentiel mitochondrial
- **Grp75** qui est présente dans la matrice mais possède également une portion extra-mitochondriale et interagit avec VDAC1
- **VDAC1**, qui permet l'entrée du Ca^{2+} à travers la membrane externe et qui est régulé par la famille Bcl-2. Seul VDAC1 peut transmettre les signaux calciques pro-apoptotiques, contrairement à VDAC2-3.
- **IP3R**, dont la probabilité d'ouverture est régulée par son interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que sa phosphorylation par AKT (PKB)
- Le **récepteur Sigma 1 (Rσ-1)**, qui est un senseur de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ et forme un complexe avec BiP : lors de la déplétion du Ca^{2+} réticulaire, le complexe se dissocie et favorise le transfert de Ca^{2+} vers la mitochondrie afin de stimuler la production d'ATP et donc la survie de la cellule

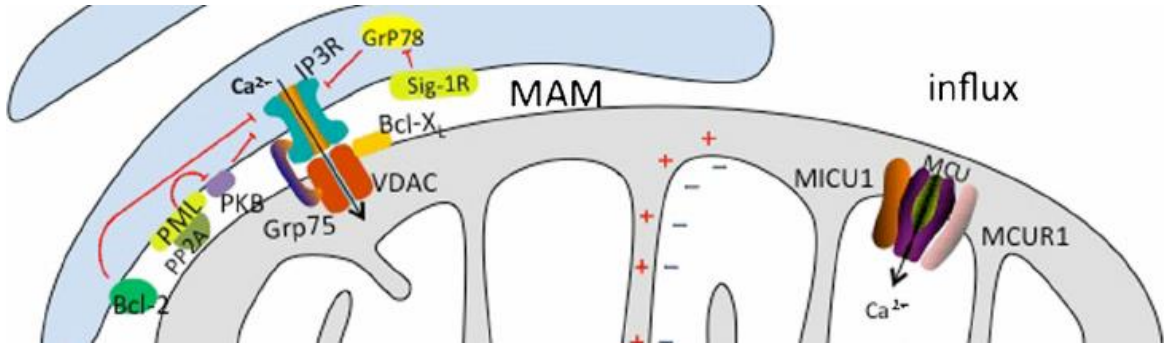


Figure 32 *Organisation et régulation des acteurs moléculaires des MAMs (extrait de Schäfer et al, Cell Tissue Res, 2014)*

L'entrée du Ca^{2+} dans la matrice se fait grâce au MCU. Les flux calciques entre l'IP3R et VDAC sont étroitement contrôlés par les membres de la famille Bcl-2, grâce à des interactions directes entre Bcl-2, Bcl-xL et les deux canaux. Les protéines anti-apoptotiques favorisent ainsi les petites oscillations favorables au métabolisme et répriment les flux massifs de Ca^{2+} vers la mitochondrie qui stimuleraient l'ouverture du PTP. Les MAMs ont ainsi été démontrées non seulement comme impliquées dans l'apoptose, mais sont essentielles au dialogue entre le RE et la mitochondrie, afin d'adapter la fonction mitochondriale à l'état du RE, en particulier lors du stress réticulaire. Ainsi, par exemple, la kinase de l'UPR PERK est enrichie aux MAMs et permet la transduction des signaux de stress induits par les ROS à la mitochondrie, favorisant l'apoptose [321].

Dans la cellule, non seulement la signature calcique est importante pour déterminer la réponse cellulaire, mais le maintien d'une $[Ca^{2+}]_{cyt}$ autour de 100nM et le contenu en Ca^{2+} des différents organites sont fondamentaux pour préserver divers processus : la maturation correcte des protéines dans le RE, l'entrée régulière de Ca^{2+} pour stimuler le métabolisme mitochondrial, etc… Ainsi, la dérégulation de cette balance peut favoriser l'apparition de cellules néoplasiques.

II. Le remodelage de la signalisation calcique dans la cellule cancéreuse

Dans la cellule cancéreuse, du fait des mutations et de l'expression aberrante des protéines impliquées dans le transport, la chélation ou l'extrusion du Ca^{2+}, la signalisation calcique est altérée et cause la dérégulation d'effecteurs impliqués dans les grandes caractéristiques de la cellule tumorale [322–328] (**Figure 33**).

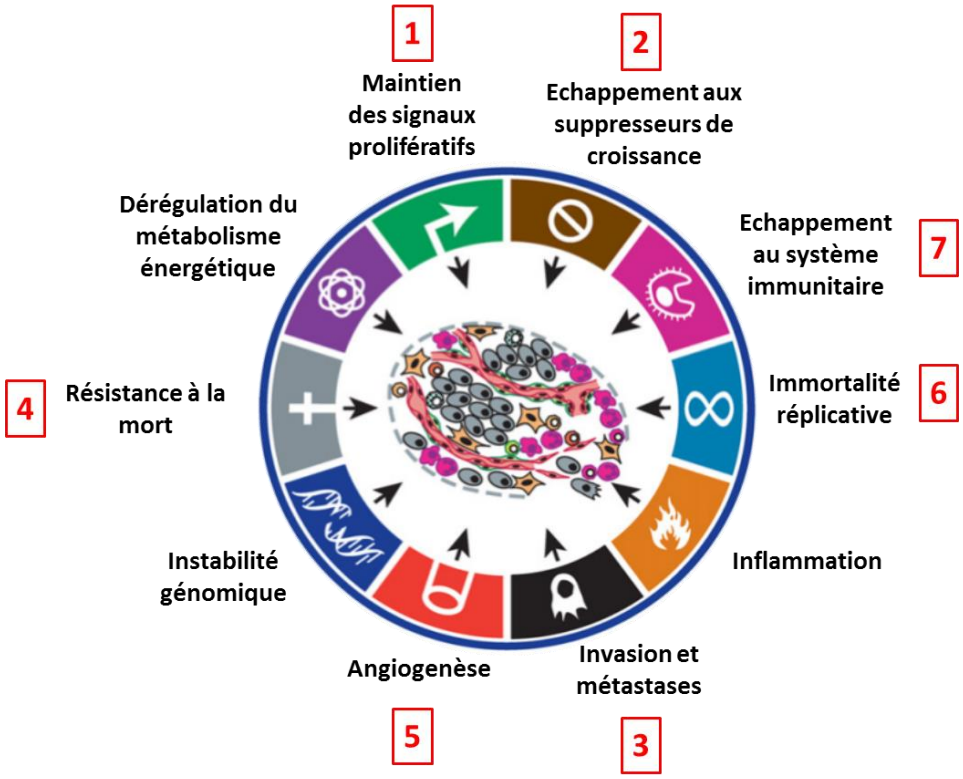


Figure 33 *Les grandes caractéristiques de la cellule tumorale (adapté de Hanahan et Weinberg, Cell, 2011)*

Dans cette partie seront donc présentées quelques aberrations de l'homéostasie et de la signalisation calciques observées dans la cellule cancéreuse en fonction du phénotype impacté :

1) **Le maintien des signaux prolifératifs**
2) **L'échappement aux suppresseurs de croissance par la dédifférenciation**
3) **La migration et l'invasion**
4) **La résistance à l'apoptose**
5) **La vascularisation tumorale**
6) **L'immortalité réplicative et le détournement de la sénescence**
7) **L'échappement au système immunitaire**

L'accent sera mis plus particulièrement sur les dérégulations décrites dans les liposarcomes.

1) Le maintien des signaux prolifératifs

Les cellules quiescentes présentent en général des élévations localisées et transitoires du Ca^{2+}, tandis que les signaux calciques favorisant la progression dans le cycle cellulaire entraînent une augmentation globale de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, nécessaire à l'activation des facteurs de transcription tels que c-Myc ou NFAT. Pour cela, on constate en général dans la cellule

cancéreuse une augmentation de l'influx calcique par les canaux SOC et TRP activés par les facteurs de croissance. De plus, une prolifération aberrante est généralement associée à une augmentation du contenu réticulaire libérable, parallèlement à l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité des canaux RyR, IP3R et des pompes SERCA (**Figure 34**).

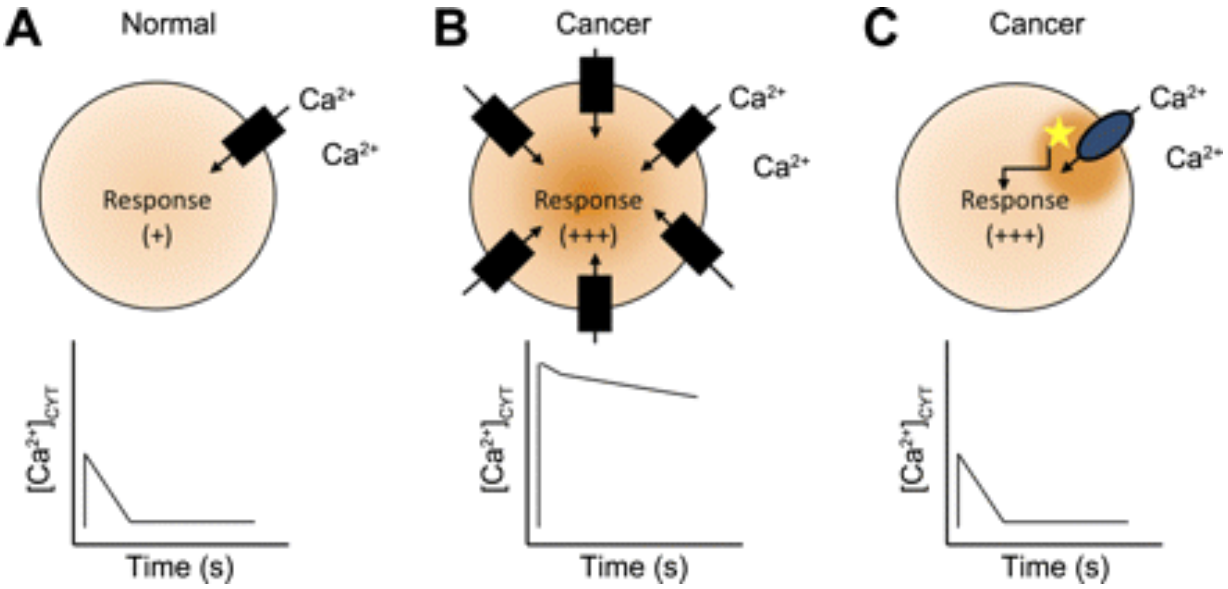


Figure 34 *Le remodelage des transporteurs du Ca^{2+} par rapport à la cellule normale* ***(A)*** *favorise la prolifération de la cellule cancéreuse par au moins deux mécanismes : d'une part* ***(B)*** *par une expression plus forte des canaux de l'influx, augmentant la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ de façon plus importante et plus globale, d'autre part* ***(C)*** *par l'augmentation de l'activité de certains canaux impliqués dans des signaux plus localisés qui participent à l'hyperactivation de certaines voies comme les MAPK.(extrait de Lee et al, Am J Physiol - Cell Physiol, 2011)*

- ***Augmentation de l'influx dans la cellule***

Par exemple, dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate, l'adrénorécepteur α1 (α1-AR) est préférentiellement couplé à TRPC6, qui active la calcineurine et stimule ainsi NFAT [306]. Le canal TRPV6 participerait à une entrée constitutive de Ca^{2+}, favorisant aussi l'activation de NFAT et la prolifération cellulaire [329]. L'expression de TRPV6 est par ailleurs associée aux tumeurs prostatiques de score 7 de Gleason [330], ce qui correspond à des tumeurs avancées peu différenciées.

L'entrée capacitive de Ca^{2+} est également impliquée dans la prolifération. Dans le cancer mammaire, l'influx de Ca^{2+} par Orai3 stimule l'expression des cyclines D1 et E ainsi que celle de CDK4 et CDK2, qui permettent la progression dans le cycle au cours de la transition G1/S, *via* l'activation d'ERK [331,332].

Par ailleurs, le remodelage calcique n'intervient pas que dans les cellules tumorales mais également dans les cellules du microenvironnement. Ainsi, il a été démontré que le traitement d'ostéoclastes avec un milieu conditionné par des cellules mammaires cancéreuses induit, *via*

la PKC et les MAPK, des oscillations calciques responsables de l'augmentation de la prolifération et de la taille des ostéoclastes [333]. Ces observations expliquent le phénomène d'ostéoclastogenèse dans le contexte des métastases de tumeurs mammaires au niveau de l'os.

Le canal TRPA1 a été découvert dans les liposarcomes, dans lesquels il est surexprimé [334]. Il s'agit d'un canal senseur de l'O_2, de la température et des stimuli mécaniques. Son rôle dans le liposarcome n'est pas encore déterminé, mais serait lié à la croissance cellulaire.

- ***Augmentation de l'extrusion et de la compartimentalisation***

De nombreux canaux TRP, de même que les canaux RyR et IP3R sont décrits comme étant surexprimés ou hyperactifs dans les cellules tumorales et favorisent la prolifération en induisant des élévations plus importantes de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Ces mécanismes nécessitent en conséquence une plus forte extrusion et compartimentalisation du Ca^{2+}, afin d'éviter la vidange du pool réticulaire et la surcharge calcique mitochondriale, qui aboutirait à l'ouverture du PTP puis la mort cellulaire. Ainsi, l'expression des PMCA et des SERCA est fréquemment altérée dans les cancers. La SERCA2b est fortement exprimée dans 70% des liposarcomes par rapport au tissu adipeux [335]. Une forte expression de la SERCA2b favorise la croissance tumorale *in vivo* d'une lignée de liposarcome [336].

La calréticuline est également impliquée dans la malignité des liposarcomes : son expression est détectée uniquement dans 87% des régions dédifférenciées du fait d'une perte du miR-1257 qui la cible [337]. L'utilisation d'ARN interférent dirigé contre l'ARN de la calréticuline réduit la prolifération des cellules de DDLPS.

2) La dédifférenciation

L'étude comparative des lignées cancéreuses avant et après induction de la différenciation par des agents chimiques a permis d'identifier des canaux ou pompes calciques altérés lors du processus de dédifférenciation, au cours de l'oncogenèse ou de la progression tumorale.

Ainsi, la différenciation de cellules de neuroblastome réduit l'entrée capacitive de Ca^{2+} [338] et augmente l'expression des pompes PMCA2 -3 et -4 [339], permettant ainsi un retour plus rapide de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ à l'état basal après une dépolarisation . La différenciation de la lignée de cancer mammaire MCF-7 par un activateur de la protéine kinase C augmente l'expression de la PMCA4b [340], réduite dans les lignées cancéreuses à l'inverse de la PMCA2 [341], et celle de lignées de carcinomes gastrique ou colorectal augmente l'activité générale de transport des PMCA [342].

Dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549, la différenciation est associée à une augmentation de l'expression de la SERCA3, qui possède une plus faible affinité pour le Ca^{2+}, et une réduction de l'expression de la SERCA2, se traduisant par une libération puis une entrée capacitive de Ca^{2+} réduites après l'application de thapsigargine, l'inhibiteur des pompes SERCA [343].

Bien que la liste des acteurs dérégulés lors de la différenciation ne soit pas exhaustive ici, il convient de remarquer qu'une tendance se dégage : après différenciation, l'influx de Ca^{2+} extracellulaire tend à être réduit, tandis que son extrusion par les PMCA est augmentée. Ceci permet d'éviter, d'une part, les augmentations massives de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et d'autre part, les élévations soutenues de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ décrites précédemment comme stimulant la prolifération. Toutefois, ces mécanismes ne sont pas universels et restent dépendants à la fois du modèle étudié et du contexte dans lequel les canaux sont activés. Enfin, des isoformes peuvent être différentiellement exprimées, du fait de leurs différences en termes d'affinité et de partenaires.

Dans les DDLPS, l'inhibition de la calréticuline, en plus de réduire la prolifération cellulaire, favorise la différenciation adipocytaire [337]. De même, l'augmentation de l'expression de la SERCA2b induit à la fois des ROS et une plus forte activation de ERK (*via* MEK), qui en conséquence phosphoryle et inactive PPARγ, un acteur majeur de l'adipogenèse [336]. En confirmation de ces observations, les auteurs montrent que les formes phosphorylées de ERK et PPARγ sont détectées dans les tumeurs de liposarcomes de haut grade (pléomorphe, dédifférencié, à cellules rondes) mais pas dans les liposarcomes bien différenciés.

3) La migration et l'invasion

Lors de l'EMT, les protéines d'adhésion et les canaux ioniques de la cellule subissent un profond remodelage. Le processus de migration fait intervenir de nombreux canaux, dont la régionalisation et l'activation séquentielle permet d'une part, l'avancée de prolongements cytoplasmiques dans le sens de la migration et d'autre part, la rétractation de la partie arrière de la cellule (**Figure 35**).

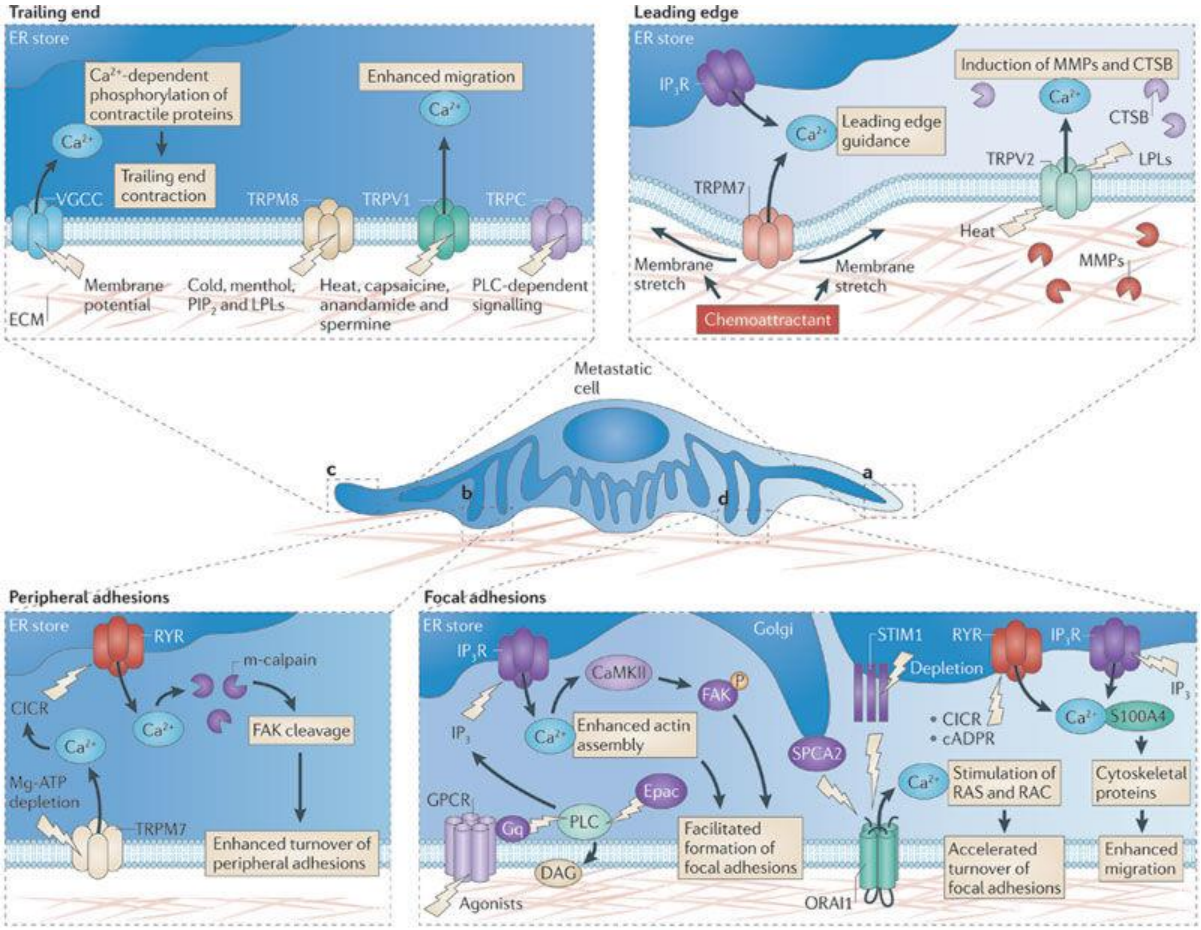


Figure 35 *Régionalisation des canaux calciques et de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire lors du processus de migration métastatique. (extrait de Prevarskaya et al, Nature Reviews Cancer, 2011)*

Sur la **Figure 35**, au niveau des prolongements cytoplasmiques du front de migration, TRPM7 couplé à l'entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC) induite par IP3R permet la réponse au chimio-attractant (exemple : chimiokine, facteur de croissance), tandis que TRPV2 permet l'exocytose de vésicules contenant les métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'adhérence de la cellule est régulée d'une part, par la coopération entre TRPM7 et les RyR, et d'autre part, par la mobilisation du Ca^{2+} réticulaire et l'ECC, qui participent au turn-over des adhésions focales et à l'activation des voies pro-migratoires Ras et Rac. Enfin, la rétractation de la cellule est dépendante de canaux voltage-dépendants qui activent la contraction du cytosquelette. Les canaux TRPM8, TRPV1 et TRPC interviennent par des mécanismes encore inconnus.

L'ensemble du calciosome impliqué dans les phénotypes de migration et d'invasion (**Figure 35**) est donc susceptible d'être modulé différemment dans la cellule cancéreuse par rapport à la cellule saine, que ce soient les canaux VOC, les canaux TRP, les canaux CRAC, les pompes et canaux du RE, ou les protéines effectrices Ca^{2+}-dépendantes (CaMKII,

calcineurine, calpaïne, S100A4 etc…). La modification de leur expression ou de leur activité est décrite dans de nombreux modèles de cancer [344].

Mais il est un autre aspect qui n'est pas abordé par la **Figure 35**, il s'agit de l'importance du transfert de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries dans la migration cellulaire. En effet, la dynamique mitochondriale, la production de ROS (qui activent entre autres la voie pro-migratoire HIF-1) et d'ATP sont essentielles à la motilité et à la dissémination métastatique [345]. Nous avons montré que dans les lignées mammaires cancéreuses, le maintien du flux de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries était indispensable à la migration induite par le ligand clivé de CD95 (cl-CD95) [346]. La localisation de Bcl-2 et Bcl-xL au RE est nécessaire aux signaux calciques induits par cl-CD95, stimulant la production d'ATP essentielle pour la migration (**Figure 36**).

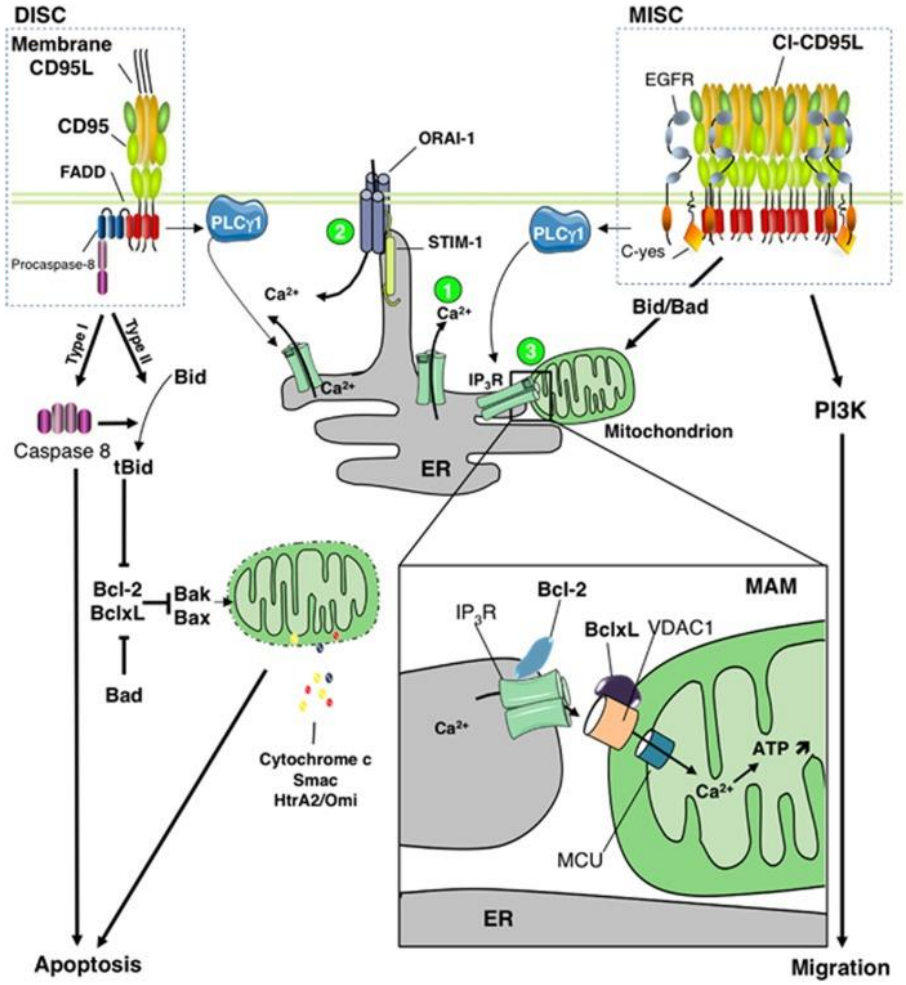


Figure 36 *L'activation canonique du récepteur à domaine de mort CD95 par son ligand transmembranaire induit l'activation des voies de l'apoptose. En revanche, la fixation de la forme clivée soluble de son ligand active une voie pro-motile, dépendante de la signalisation calcique initiée par le recrutement de la PLCγ1 et des flux calciques modulés par Bcl-2 et Bcl-xL entre le RE et la mitochondrie. (extrait de Fouqué et al, Cell Death Differ, 2016)*

Peu de données sont disponibles sur le rôle du Ca^{2+} dans la migration et la dissémination métastatique des liposarcomes. Il a été montré que la lignée cellulaire SW872 exprimant S100A4, dont une forte expression est associée à un comportement métastatique, répond à IL-1α en produisant la métalloprotéase MMP2 et la glycoprotéine TIMP1, ce qui favorise l'invasion cellulaire [347]. Toutefois, les auteurs ne font pas la démonstration que S100A4 est essentielle à cette réponse. Sa pertinence quant à la progression métastatique des liposarcomes reste donc à être étudiée.

4) La résistance à l'apoptose

Le Ca^{2+} est un messager versatile qui peut induire l'apoptose de la cellule comme participer à des signaux pro-survie [275].

La mort induite par le Ca^{2+} intervient notamment par la déplétion du Ca^{2+} réticulaire. D'une part, ceci induit le stress du RE qui active la transcription et l'activation d'acteurs pro-apoptotiques par les voies de l'UPR. D'autre part, du fait de la communication entre le RE et la mitochondrie, le Ca^{2+} s'accumule dans ces dernières et entraîne l'ouverture du PTP. Par ailleurs, l'accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries, due à l'influx par les canaux membranaires et à l'efflux depuis les compartiments intracellulaires, active la mort cellulaire (**Figure 37**).

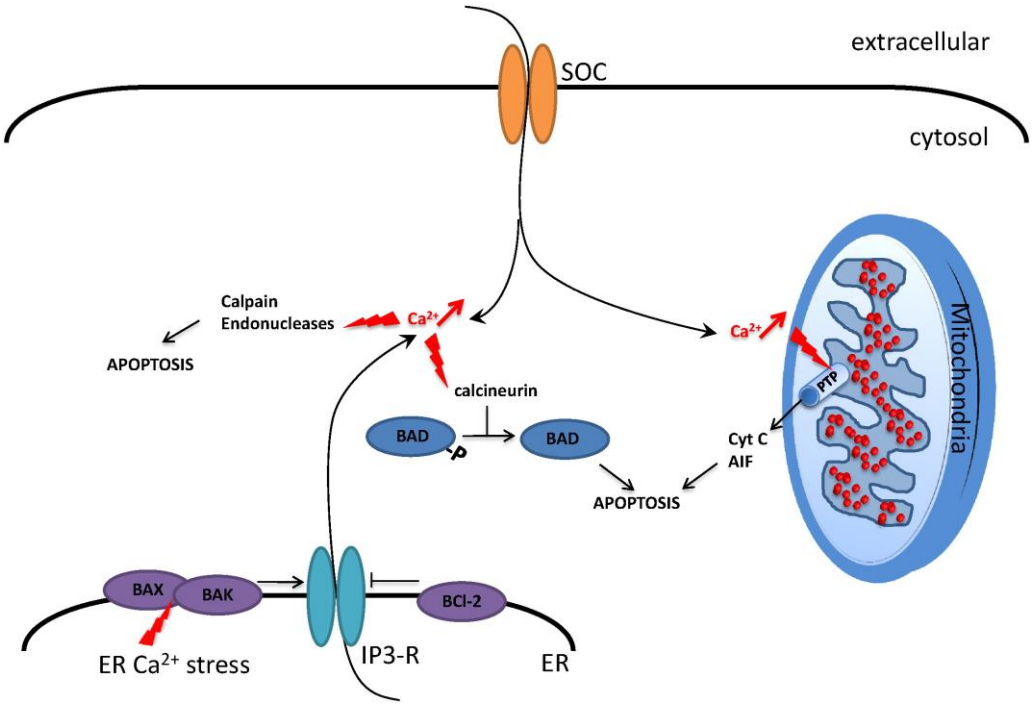


Figure 37 *L'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ active l'apoptose par la calpaïne, lève l'inhibition du pro-apoptotique Bad et participe à la surcharge calcique mitochondriale. D'autre part, la déplétion du Ca^{2+} réticulaire, favorisée par les pro-apoptotiques Bax et Bak, participe aux deux phénomènes. (extrait de Dubois et al, BBA - Mol Cell Res, 2016)*

Les cellules cancéreuses ont donc développé des stratégies pour inhiber ces processus. Afin d'éviter une libération massive de Ca^{2+} par le RE qui entraînerait une surcharge mitochondriale, le contenu réticulaire en Ca^{2+} est réduit dans la cellule tumorale, de même que l'entrée de Ca^{2+} par les canaux SOC. Ces mécanismes sont parfaitement illustrés par les cellules prostatiques cancéreuses, dans lesquelles la surexpression de l'anti-apoptotique Bcl-2 :

- réduit le nombre de canaux SOC fonctionnels
- augmente la fuite de Ca^{2+} réticulaire, possiblement en interagissant avec les IP3R
- diminue le re-pompage du Ca^{2+} par la baisse d'expression des SERCA et de la calréticuline [310].

Ce remodelage de l'homéostasie calcique est associé à une résistance accrue à l'apoptose et à la différenciation neuroendocrine, une forme avancée du cancer prostatique indépendante des androgènes [348]. Ces mécanismes sont observés dans de nombreux types de cancer, mais ne sont pas universels et suggèrent la mise en place de phénomènes de compensation, surtout concernant la réduction du contenu calcique réticulaire.

- **La régulation de l'influx de Ca^{2+} à la membrane plasmique**

Si la diminution de l'influx de Ca^{2+} est une stratégie de protection pour la cellule, elle dépend toutefois du contexte. En effet, bien que la diminution de l'expression d'Orai1 durant la cancérogenèse des tumeurs de la prostate soit associée à une résistance accrue à divers inducteurs de mort [349], l'entrée capacitive de Ca^{2+} par ce canal permet cependant l'inhibition de l'apoptose induite par CD95 ou le rituximab dans les lymphocytes, comme l'ont démontré les travaux de l'équipe [317,318].

En outre, un des acteurs majeurs de la résistance à l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort est c-FLIP (*cellular FADD-like IL-1β-converting enzyme inhibitory protein*) [350], qui peut notamment être activé par la calmoduline et la CaMKII.

Parmi les stress que peut subir la cellule au sein de la tumeur figure l'hypoxie, qui entraîne rapidement une élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ [351]. Dans les gliomes, il a été montré que l'hypoxie induit la voie IGF-1R-PLC-IP3R qui active TRPC6 [352]. L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 est ensuite essentiel à la stabilité de HIF-1α, et donc à son activité transcriptionnelle régulant notamment le métabolisme du glucose et la survie.

Enfin, dans le cancer de la prostate, Orai1 et TRPC1 coopèrent pour le recrutement de TRPV6 à la membrane plasmique, ce qui participe à l'agressivité et à la résistance à

l'apoptose[353]. L'activation de TRPA1, découvert dans les liposarcomes mais dans lesquels son rôle n'a pas été étudié, protège les cellules pulmonaires cancéreuses de l'apoptose en activant une src kinase et ERK [354].

Bien que toutes ces observations semblent contradictoires avec les études citées précédemment, une des significations possibles de l'augmentation de l'influx calcique par les canaux de la membrane pourrait être un mécanisme de compensation pour le remplissage du RE.

- **La réduction du contenu réticulaire en Ca^{2+}**

La quantité de Ca^{2+} libérable par le RE est réduite afin de limiter les risques d'une surcharge mitochondriale ou du clivage de la pro-caspase-12 par la m-calpaïne (activée par le Ca^{2+}). La réduction du contenu en Ca^{2+} du RE est donc fréquemment observée et implique de multiples mécanismes. Ainsi dans le cancer du poumon, on constate également une réduction de l'expression de la calréticuline et de la SERCA2, mais une augmentation de l'expression de l'IP3R [355]. Le canal résident du RE TRPP2 réduirait aussi le contenu libérable du RE, en augmentant la fuite, et protègerait ainsi de l'apoptose [314].

Dans un sous-clone de la lignée A549 résistant au paclitaxel, une chimiothérapie qui inhibe la dépolarisation des microtubules lors de la mitose, le contenu réticulaire en Ca^{2+} est également diminué, sans altération de l'expression des SERCA (ce qui n'exclut pas une diminution de leur activité) mais avec une expression plus importante de Bcl-2 et de la sorcine [356]. La sorcine est une protéine possédant des domaines « EF hand » et impliquée dans la chimiorésistance à de multiples drogues [357].

- **Les voies de compensation**

La réduction du contenu réticulaire en Ca^{2+} affecte l'homéostasie réticulaire et la maturation des protéines. De fait, les cellules cancéreuses présentent un stress réticulaire chronique. Elles doivent donc, d'une part, compenser l'éventuelle fuite du Ca^{2+} réticulaire et d'autre part, favoriser les voies pro-survie de l'UPR par rapport à celles qui sont pro-apoptotiques.

Un des mécanismes de résistance au stress du RE est la surexpression dans les tissus tumoraux de Grp78/BiP, qui par conséquent participe également à la chimiorésistance de nombreux modèles de cancers [358]. Peu de données sont disponibles quant au stress du RE dans les liposarcomes, cependant il est à noter que le virus du sarcome de Rous, qui entraîne le

développement de sarcomes chez le poulet, provoque une surexpression de BiP dans les fibroblastes des embryons de poulets infectés [359].

Amplifier le stress réticulaire basal est donc une stratégie thérapeutique intéressante, y compris dans les liposarcomes. Il a été montré que la curcumine, très étudiée pour ses propriétés anti-cancer, induisait l'apoptose des cellules de liposarcomes par le stress du RE en inhibant la SERCA2b [335].

Outre les SERCA, une autre cible potentielle est l'interaction entre Bcl-2 et IP3R, pour laquelle un peptide a été développé et vise à augmenter le transfert de Ca^{2+} vers la mitochondrie, favorisant ainsi l'apoptose [360]. En effet, le devenir de la cellule est très dépendant du dialogue entre le RE et la mitochondrie, qui fait intervenir les acteurs de l'UPR, la famille Bcl-2 et les flux de Ca^{2+} (**Figure 38**). Bcl-2 et Bcl-xL sont donc fréquemment surexprimées.

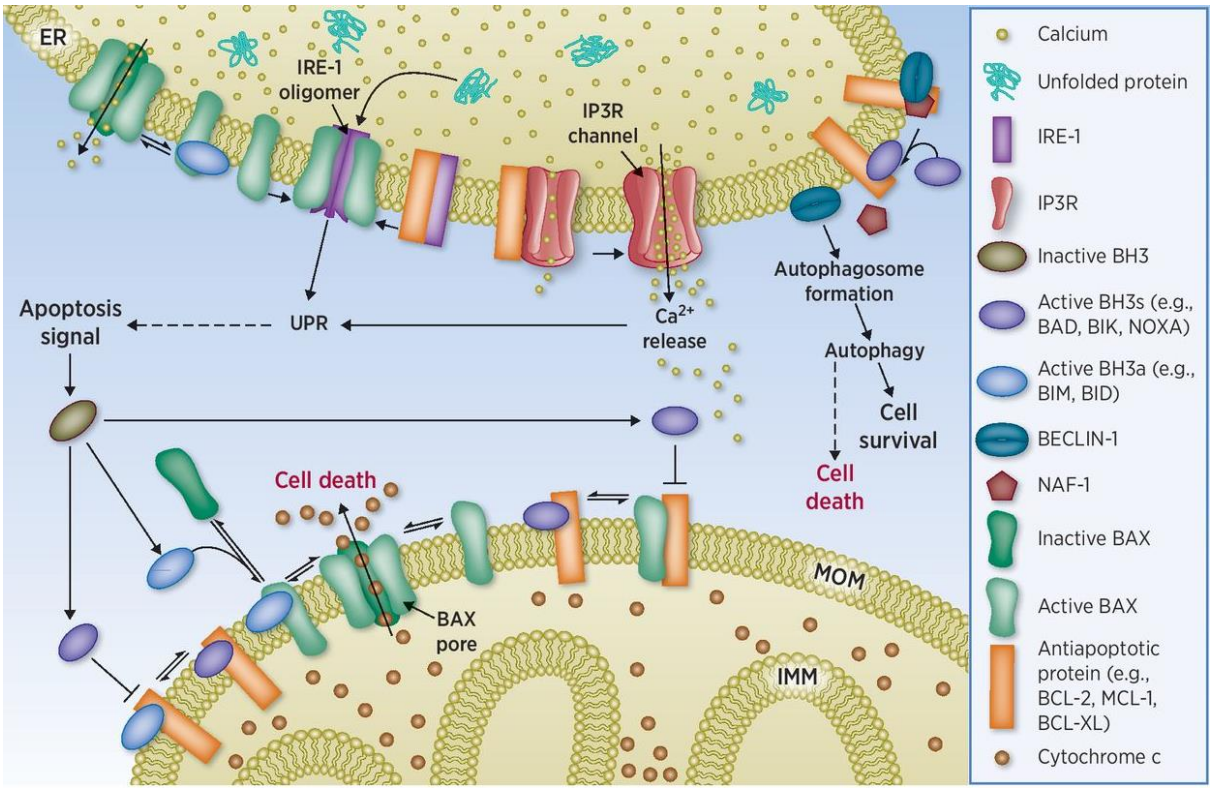


Figure 38 *Interactions entre la famille Bcl-2 et les voies anti- ou pro-apoptotiques activées par le stress du RE. (extrait de Brahmbatt et al, Clin Cancer Res., 2015)*

Les protéines anti-apoptotiques séquestrent les protéines BH3-only et les pro-apoptotiques Bax et Bak pour prévenir, d'une part, leur activation et l'ouverture du PTP à la mitochondrie, et d'autre part, la fuite de Ca^{2+} du RE induite par Bax. De plus, Bcl-2 inhibe la libération de Ca^{2+} par IP3R, tandis que Bcl-xL réduit la perméabilité de VDAC1 au Ca^{2+} pour

éviter l'entrée massive de Ca^{2+} dans la mitochondrie. La protéine BH3-only Bad, qui inhibe Bcl-2 et Bcl-xL, est séquestrée dans le cytoplasme *via* sa phosphorylation par ERK et AKT.

La perturbation des flux calciques entre le RE et les mitochondries peut aussi activer l'autophagie, un processus de dégradation et de recyclage souvent considéré comme un mécanisme de survie impliqué dans la chimiorésistance [361]. En effet, l'autophagie permet l'élimination des protéines mal repliées et des organites endommagés, favorisant la survie de la cellule face aux divers stress auxquels elle doit faire face. L'autophagie permet l'adressage des constituants cellulaires vers les lysosomes, grâce à différentes étapes conduisant une vésicule, renfermant les cibles à dégrader, à subir plusieurs phases de maturation jusqu'à la fusion avec les lysosomes. L'autophagie fait intervenir, selon les étapes, des complexes différents de protéines Atg (A*utophagy-related gene*), la conversion de LC3-I en LC3-II, la protéine p62 et les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL.

Il est désormais admis que le Ca^{2+} est essentiel au processus autophagique [362]. Toutefois le contrôle exercé par la signalisation calcique est complexe et l'autophagie partage de nombreuses voies avec l'apoptose. Dans certains contextes, il ne s'agit d'ailleurs pas d'un mécanisme de survie et on assiste à une « mort autophagique ». Les voies d'activation de l'apoptose et de l'autophagie induites par le stress calcique du RE sont fortement imbriquées, comme illustré sur la **Figure 39**.

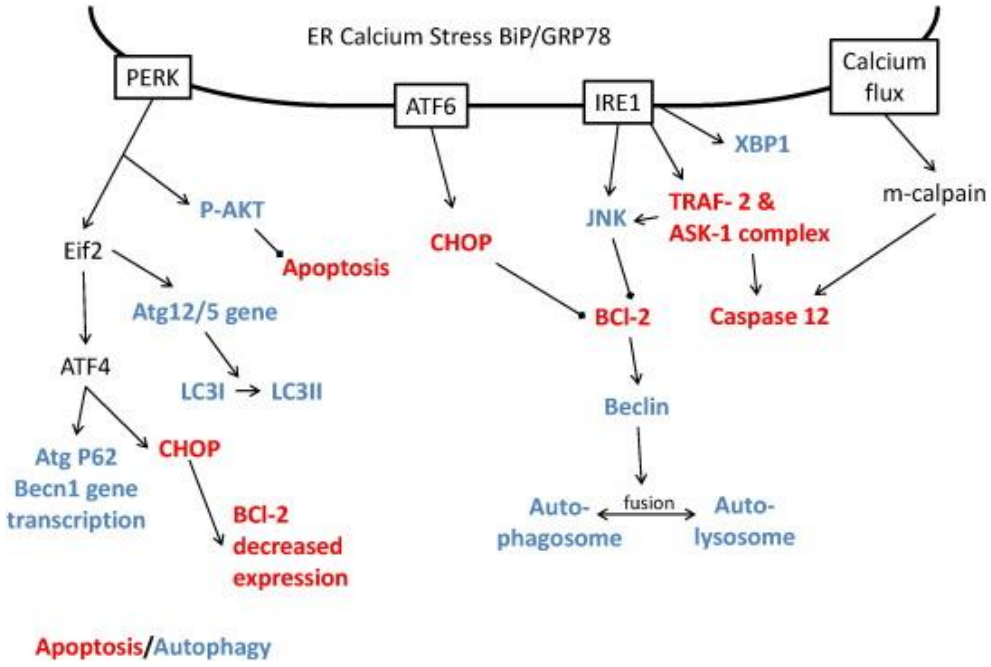


Figure 39 *Le stress du RE, induit par l'altération de l'homéostasie calcique intracellulaire, active à la fois des voies pro-autophagiques et des voies pro-apoptotiques. (extrait de Dubois et al, BBA - Mol Cell Res, 2016)*

La balance qui résulte de l'activation de ces voies détermine le destin cellulaire. Ainsi, par exemple, PERK active d'une part AKT, qui protège de l'apoptose, et d'autre part eIF2α, qui active à la fois le pro-apoptotique CHOP et la transcription des gènes de l'autophagie.

Les mécanismes de compensation activés par la réduction du contenu réticulaire en Ca^{2+} (UPR, dépendance vis-à-vis des anti-apoptotiques, autophagie) sont donc complexes, impliqués dans la résistance au traitement, mais sont aussi accompagnés de l'induction de voies pro-apoptotiques. Favoriser leur activation par rapport à celle des acteurs pro-survie est donc une stratégie thérapeutique majeure.

5) La vascularisation tumorale

La vascularisation de la tumeur est une étape critique dans la progression tumorale, pour l'apport des nutriments et de l'O_2 d'une part, et pour la dissémination métastatique d'autre part. Elle repose sur la capacité des tumeurs à sécréter dans le microenvironnement des facteurs tels que l'endothéline 1, l'Angiotensine II, le bFGF (FGF2) et le VEGF qui vont attirer les cellules endothéliales vasculaires et favoriser leur prolifération pour initier l'angiogenèse. Tous ces signaux, qui agissent par une communication paracrine, initient des signaux calciques intracellulaires qui pourraient donc faire l'objet d'un ciblage thérapeutique afin de les inhiber.

D'autre part, dans le microenvironnement, la signalisation calcique fait également l'objet d'un remodelage dans les progéniteurs des cellules endothéliales vasculaires eux-mêmes, comme cela a été observé dans le contexte du carcinome cellulaire rénal [363]. Les auteurs ont ainsi constaté dans ces progéniteurs une entrée capacitive de Ca^{2+} amplifiée, *via* l'augmentation de l'expression de STIM1, d'Orai1 et de TRPC1. Ceci favorise la prolifération et la tubulogenèse, deux processus essentiels à la néo-angiogenèse. D'autre part, dans le cancer du sein, le canal TRPV4 est relocalisé préférentiellement à la membrane plasmique des cellules endothéliales, augmentant ainsi leur migration induite par les facteurs angiogéniques [364].

Le remodelage de la signalisation calcique ne concerne donc pas que les cellules tumorales mais s'étend aux cellules du microenvironnement, participant au détournement des cellules de l'organisme au profit du développement de la tumeur.

6) L'immortalité réplicative et le détournement de la sénescence

L'échappement à la sénescence induite par les oncogènes est considéré comme un des mécanismes premiers de l'oncogenèse. En effet, la sénescence est en principe un processus irréversible grâce à l'action des suppresseurs de tumeur p53 et pRb (*Retinoblastoma protein*).

Toutefois, lorsque p53 et pRb sont inactivés, un événement très fréquent dans les cancers, la cellule peut redémarrer un nouveau cycle cellulaire et donc proliférer. Il a été démontré pour certains modèles que l'inactivation de p53 et Rb intervenait très tôt dans l'oncogenèse, car elle est observable dans certaines lésions pré-cancéreuses [365].

Le Ca^{2+} intervient et régule différents aspects de la sénescence [366]. En premier lieu, le Ca^{2+} module l'activité des télomérases [367] et de p53, principalement par l'intermédiaire de complexes engageant des protéines de la famille S100 [368–370]. De plus, la sénescence réplicative ou celle induite par les oncogènes entraîne la libération de la Ca^{2+} par l'IP3R2, qui ensuite s'accumule par le MCU dans les mitochondries et favorise la production de ROS [371]. Les auteurs montrent que l'ablation d'IP3R2 ou du MCU permet l'échappement à la sénescence. D'autre part, au cours de la sénescence, le volume de la cellule augmente, ce qui est rapidement contrecarré par l'entrée de Ca^{2+}, *via* TRPV4 et TRPM7 par exemple, et par l'extrusion de K^+ et Cl^-, qui entraîne la sortie d'eau hors de la cellule.

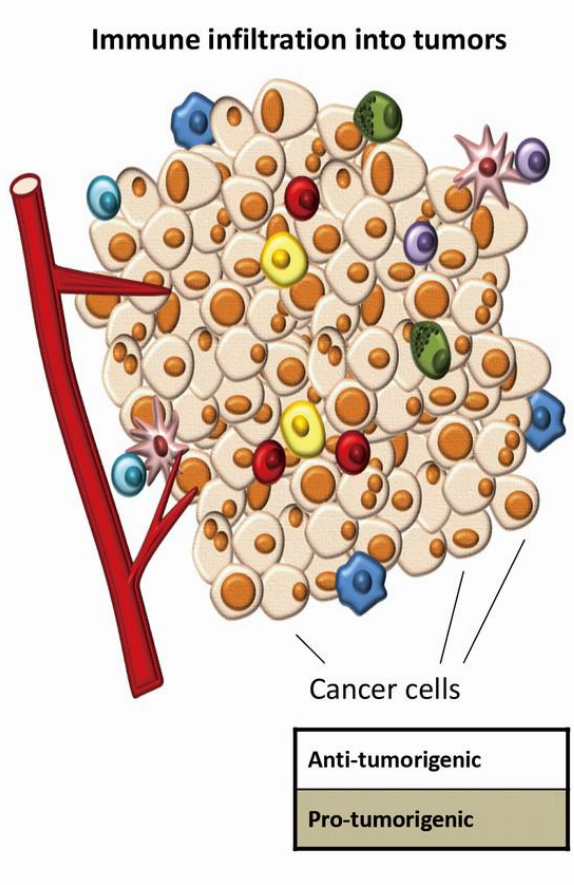
Certains facteurs de transcription régulés par le Ca^{2+} participent à la signalisation de la sénescence. Par exemple, NFκB joue un rôle central dans le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). En effet, les cellules sénescentes sécrètent de nombreux facteurs dans le microenvironnement, parmi lesquels des chimiokines, des facteurs de croissance, des métalloprotéases, des interleukines anti-inflammatoires… Ce sécrétome est désormais très étudié car, si certaines stratégies thérapeutiques sont développées afin d'induire la sénescence des cellules tumorales, il est maintenant connu que les facteurs du SASP favorisent la survie, la prolifération, la migration des cellules à proximité, et donc la progression tumorale [372]. Enfin, il est également décrit que la sénescence est un mécanisme de chimiorésistance car les cellules tumorales ayant désactivé p53 et/ou pRb sont capables de rendre ce processus réversible et de reprendre le cycle cellulaire[373,374].

Le Ca^{2+} intervenant dans l'exocytose des facteurs du SASP, ainsi que dans la signalisation de la sénescence et le détournement des cellules du microenvironnement, mieux comprendre les mécanismes mis en jeu pourra peut-être faire émerger de nouvelles cibles thérapeutiques agissant à la fois sur les cellules tumorales et leur niche.

7) Echappement au système immunitaire

L'échappement au système immunitaire est un des obstacles majeurs à la lutte contre le cancer. Les cellules tumorales disposent de nombreuses stratégies pour échapper à la

surveillance immunitaire. De plus, de nombreux travaux montrent que l'infiltration de certaines cellules immunitaires, telles que les macrophages, favorise la survie et le développement de la tumeur, grâce à la sécrétion de molécules de l'inflammation dans le microenvironnement [375] (**Figure 40**). La nature des cellules infiltrées, leur densité et leur localisation (intra-tumorale et aux marges) permet le calcul d'un immunoscore, qui se révèle être un bien meilleur facteur prédictif de la survie du patients que la classification TNM, dans le cas des tumeurs colorectales par exemple [376].



Immune Cell		Roles in cancer
	Dendritic cell (DC)	Release cytotoxic cytokines Antigen presentation to T cells
		Suppress T cell functions Promote tumor growth and progression
	T cell (CD8+, CD4+)	Directly lyse cancer cells Release cytotoxic cytokines
		Release tumor promoting cytokines
	Treg	Restore homeostasis to reduce chronic inflammation
		Suppress anticancer immune responses Stimulate inflammatory cytokine production
	Macrophage	Release cytotoxic cytokines Antigen presentation to T cells
		Promote angiogenesis, tumor proliferation, chemotaxis, invasiveness, and metastasis
	Myeloid derived suppressor cell (MDSC)	Limited
		Suppress T cell functions Recruit immunosuppressive immune cells
	NK cell	Release cytotoxic cytokines Directly cytotoxic to cancer cells
		Limited

Figure 40 *Schématisation des principales cellules immunitaires infiltrées dans le microenvironnement tumoral et de leurs rôle pro- et anti-tumoraux respectifs. (extrait de Markman et Shiao, J Gastrointest Oncol, 2015)*

Un des mécanismes permettant la reconnaissance par le système immunitaire d'une cellule à éliminer est l'exposition à la surface de la cellule cible des phosphatidylsérines (PS). Dans une cellule saine, les PS sont transférées par des flippases, des enzymes Ca^{2+}-dépendantes, vers le feuillet interne de la membrane plasmique où elles participent à diverses fonctions parmi lesquelles l'activation de certaines protéines comme AKT ou la PKC. Lors de l'apoptose, les PS subissent un flip-flop et leur localisation sur le feuillet externe constitue un signal « eat-me » pour les macrophages. De façon surprenante, il a été observé que les PS sont présentes à la

surface des cellules cancéreuses viables [377]. L'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans les cellules tumorales est en partie responsable de la localisation des PS sur le feuillet externe, car le Ca^{2+} inhibe l'activité des flippases [378]. Bien que de cette façon elles soient reconnues par les macrophages, la phagocytose de la cellule tumorale est inhibée, principalement parce que cette dernière exprime fortement CD47. L'importance biologique de l'exposition des PS par la cellule cancéreuse est peu connue, toutefois on peut émettre l'hypothèse qu'elle participe au recrutement et au détournement du système immunitaire.

Les PS ne sont pas les seuls signaux reconnus par le système immunitaire. La réponse immunitaire peut être sollicitée par de multiples marqueurs, constituant les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP, *Damage-Associated Molecular Pattern*), parmi lesquels la translocation à la surface de la cellule de chaperonnes réticulaires, telles que la calréticuline ou BiP [330,331].

La reconnaissance de la calréticuline par les macrophages ou les cellules dendritiques entraîne la mort immunogénique. Cette dernière est favorisée par certaines chimiothérapies (les anthracyclines et l'oxaliplatine) ou les photosensibilisateurs (l'hypericine, une fois activée par la lumière, inhibe la SERCA2 et donc induit une déplétion du Ca^{2+} réticulaire associée à une forte génération de ROS) (**Figure 41**).

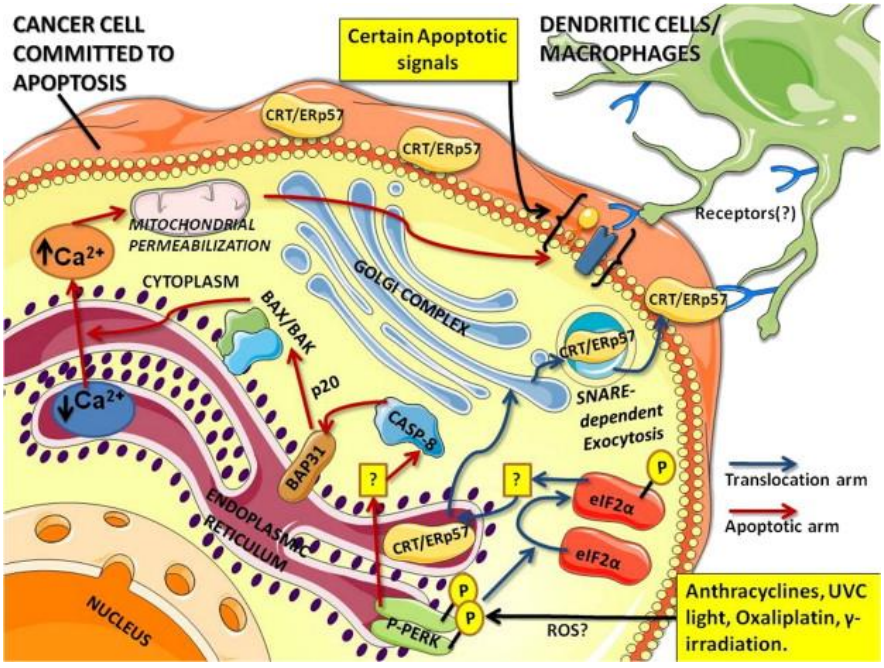


Figure 41 *La déplétion du Ca^{2+} réticulaire induit l'apoptose de la cellule par surcharge mitochondriale d'une part, et la mort immunogénique par exposition de la calréticuline à la surface de la cellule d'autre part. Ce type de mort cellulaire peut être activé par les anthracyclines, l'oxaliplatine, l'irradiation aux rayons γ ou la photothérapie. (extrait de Garg et al, Cancer, 2010)*

Comme illustré sur la **Figure 41**, ces différentes stratégies thérapeutiques activent la kinase PERK, qui phosphoryle eIF2α [381]. Cette étape est nécessaire à l'activation partielle de la caspase 8, qui clive la protéine réticulaire BAP31, et au changement de conformation de Bax et Bak. Après son transit par l'appareil de Golgi, la calréticuline est ensuite sécrétée par exocytose, qui est contrôlée par les protéines SNARE. Les auteurs montrent que chacun des intermédiaires est nécessaire à l'exposition de la calréticuline. Le stress calcique du RE est donc une cible présentant un fort intérêt aussi pour stimuler la mort immunogénique des cellules tumorales [382].

Le Ca^{2+} participant à l'ensemble des processus cellulaires, c'est sans surprise que le remodelage de sa signalisation dans la cellule cancéreuse est impliqué dans les grandes caractéristiques de l'oncogenèse et de la progression tumorale. Les différents aspects de la signalisation calcique favorisant la survie de la cellule sont résumés dans la Figure 42.

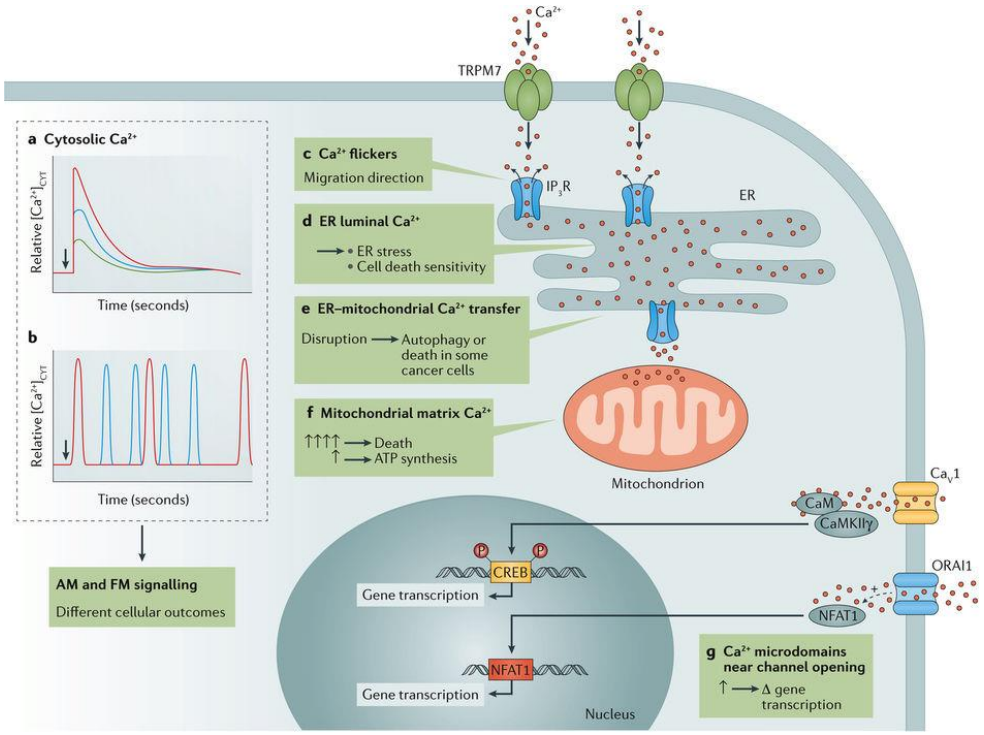


Figure 42 *Aspects de l'homéostasie calcique remodelés dans la cellule cancéreuse. (extrait de Monteith et al, Nature Reviews Cancer, 2017)*

Le signal calcique est interprété selon (a) son amplitude, (b) sa fréquence et sa (c) localisation, ce qui détermine le devenir de la cellule (prolifération, apoptose, migration…). Pour cela, la régulation (d) du contenu en Ca^{2+} du RE est essentielle et son altération affecte, (e) *via* les zones de communication privilégiées appelées MAMs, (f) le métabolisme et l'intégrité des mitochondries. (g) La survie est également favorisée par l'activation de facteurs de transcription (CREB, NFAT) recrutés à proximité des canaux calciques.

Certains mécanismes diffèrent selon le type de cancer, selon le patient ou même au sein de la même tumeur. Le remodelage de la signalisation calcique en faveur de la survie est donc complexe et doit être envisagé non pas comme une série de mécanismes isolés universels, mais comme un ensemble d'altérations conservées par les pressions de sélection dans un environnement spécifique, coopérant pour compenser les déséquilibres liés aux mutations et aux divers stress subis par la cellule au cours de sa transformation, puis de l'évolution de la tumeur.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Le rôle de Klotho dans la longévité est principalement dû à son action sur la signalisation de l'insuline/IGF-1, une voie altérée dans les liposarcomes et impliquée dans la chimiorésistance.

Les liposarcomes dédifférenciés (DDLPS) sont des tumeurs associées à un mauvais pronostic et à une forte résistance au traitement. Le remodelage de la signalisation calcique et son impact sur la réponse au traitement n'ont jamais été abordés dans le contexte de ces tumeurs, bien que certains de ses acteurs (SERCA, calréticuline, S100…) et le stress du RE aient fait l'objet de travaux montrant qu'ils étaient impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des DDLPS.

L'objectif de ma thèse était donc d'appréhender l'impact éventuel de Klotho dans les DDLPS, en particulier vis-à-vis de la signalisation dépendante d'IGF-1R, de l'homéostasie calcique, de la sensibilisation à l'apoptose et de mettre en évidence les liens possibles entre ces voies.

Les résultats ont mis en évidence un mécanisme de sensibilisation des DDLPS à la mort cellulaire induite par une chimiothérapie, la gemcitabine. En conséquence, au cours de ma thèse, j'ai également testé l'efficacité *in vitro* et *in vivo* d'une combinaison thérapeutique, celle du BH3-mimétique ABT-263 et de la gemcitabine, sur des lignées cellulaires de DDLPS.

MATERIEL ET METHODES

Les méthodes d'imagerie du Ca^{2+}, cytosolique ou mitochondrial

Elles ont fait l'objet d'une publication dans le livre *CD95 (Methods in Molecular Biology 2017;1557:79-93)*, dans le cadre de l'étude de la signalisation calcique de CD95 au cours de mes stages de Master. Les méthodes et outils qui y sont décrits sont les mêmes que ceux utilisés durant ma thèse. Ces expérimentations ont été réalisées avec Pierre VACHER et Thomas DUCRET au CRCTB de Bordeaux. Le reste des techniques est à la suite de l'article.

Chapter 7

CD95-mediated Calcium Signaling

Mehdi Hammadi, Vanessa Delcroix, Anne-Marie Vacher, Thomas Ducret, and Pierre Vacher

Summary
Intracellular calcium signals regulate cell function and cell survival by controlling many processes. CD95 engagement results in distinct intracellular calcium signals that control the cell fate, apoptosis or survival, depending on the ligand (membrane or soluble). Intracellular calcium determination is an exquisite read-out to explore the molecular mechanisms elicited by CD95 engagement. The most widely applied methods for studying calcium signaling pathways use fluorescent indicators and imaging methods with fluorescence microscopy. This technical approach, however, requires many precautions that we will discussed in this chapter.

Key words: fura2, fluo2, Rhod2, MitoTracker, mitochondria, pluronic acid® F-127, confocal microscopy

---

1- Introduction

Calcium ion (Ca^{2+}) is a ubiquitous second messenger in the activation of pleiotropic signaling cascades (*1, 2*). Intracellular Ca^{2+} signals regulate cell function and cell survival by driving activation of a range of spatially and temporally distinct cellular and physiological processes. On the other hand, prolonged cytoplasmic elevation of free Ca^{2+} is toxic and triggers cell death. Ca^{2+} pumps, Ca^{2+} channels, Ca^{2+} exchangers and Ca^{2+}-binding proteins present at the plasma membrane and in different cellular compartments (endoplasmic reticulum, lysosome, mitochondria, golgi apparatus) tightly regulate the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) (*2-4*) between a resting (~ 100 nM) and an activated state (~ 1 μM). In response to various stimuli, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ can reach 10 μM and higher in microdomains like the interface (mitochondria-associated ER membranes, MAM) between the endoplasmic reticulum (ER) and the mitochondria (*5-6*). This $[Ca^{2+}]$ increase can be evoked by mobilizing Ca^{2+} from intracellular

stores, such as ER and Golgi apparatus, or by Ca^{2+} entry from the extracellular environment (*2-4,7*). Upon elevation of cytoplasmic Ca^{2+}, energy-dependent active transporters, including pumps and exchangers, work to refill stores, reset Ca^{2+} levels to the resting state.

There is increasing evidence for the importance of Ca^{2+} homeostasis in cancer (*8*). A majority of the hallmarks of cancer (*9*), if not all, involve Ca^{2+} signaling to mediate critical cellular processes, including metastasis and bypass of apoptosis. We have recently shown that CD95 engagement by the pro-apoptotic dodecameric ligand (IgCD95L) led to an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ that exerts a negative retro-control on the CD95 apoptotic signaling (*10*). On the other hand, the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ elicited by the non-apoptotic, soluble ligand (Cl-CD95L) promotes cell migration (*11*) and metastasis (*12*).

The versatility of Ca^{2+} as an intracellular messenger stems largely from the complex spatiotemporal organization of the Ca^{2+} signals. As Ca^{2+} signals are frequently oscillating, they require single cell analyses since the processes may otherwise be masked by the population average (Figure 1). Fluorescence single cell imaging has been the only possible approach to resolve the cell-to-cell heterogeneity and the complex subcellular spatiotemporal organization of the cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} signals and downstream events (Figures 2-3). All the imaging methods (conventional fluorescence microcopy, flow cytometry, confocal and two-photon microscopy techniques) are based on the introduction of fluorescent Ca^{2+} indicators into the living cells. The application of cell permeable, synthetic calcium indicators (*10-13*) is still widely used in *in vitro* Ca^{2+} signaling studies. Loading of the cells with the Ca^{2+} probes requires special care, (i) the liberation of the Ca^{2+} indicator dye from the cell permeable compound and the photodamage that can result upon prolonged excitation with high energy photons may generate toxic metabolites, (ii) intracellular dye accumulation may significantly alter signaling by providing a Ca^{2+} buffer system, (iii) the distribution of the dye between cells, and inside subcellular compartments may cause misinterpretations. The loading procedure has to be carefully controlled and to be adapted for each cell model. The aim is to achieve a high signal/noise ratio while limiting the probe concentration and loading duration. In some cell models, such as lymphocytes, the loading is carried out at room temperature to avoid probe compartmentalization (Figure 4).

2- Materials

2.1- Solutions

1. Cell culture medium: DMEM 1X (Dulbecco's) supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine.

2. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution): 142.6 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4, 0.2 mM KH_2PO_4, 5 mM Glucose, 4 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$; buffered to pH: 7.3 with NaOH; osmolality adjusted to 300+/-10 $mOsmol.kg^{-1}$. HBSS is prepared using ultrapure water (purified deionized water to attain a sensitivity of 18 MΩ.cm).

3. Pluronic® acid F-127 (Molecular Probes): 20% in DMSO (w/v) (Note 1). Store solution at room temperature. Do not refrigerate or freeze the solutions because Pluronic® F-127 may come out of solution.

2.2- Probes

a) Cytosolic Ca^{2+} measurements

Fura-PE3 (-AM) (Teflabs, Austin, TX, USA). Fura-PE3 is a leakage resistance version of Fura-2 with an appendage that increases the intracellular retention. It is identical to Fura-2 in fluorescence properties. Fura-PE3 is supplied in a set of 20 vials containing 50 µg stored at -20°C and protected from the light. The probe solution is reconstituted in 60 µL of anhydrous dimethyl-sulfoxide (DMSO) (stock solution: 1 mM) and then used as soon as possible (within a week, stored at -20°C) to avoid decomposition with subsequent loss of cell loading capacity (Note 2).

Fluo2-Leak Resistant (-AM) (Teflabs, Austin, TX, USA). Fluo 2-LR is supplied in a set of 20 vials containing 50 µg stored at -20°C and protected from the light. The probe solution should be reconstituted in 47 µL of anhydrous DMSO and then used as soon as possible (within a week, stored at -20°C) to avoid decomposition with subsequent loss of cell loading capacity (Note 2). Although Fluo-2 is a single excitation-emission dye, it has a number of advantages for investigators, including an ideal dissociation constant (Kd) value and high quantum yield, meaning that it can be used at low concentrations that introduce minimal buffering.

b) Mitochondrial Ca^{2+} measurements

Rhod-2 (-AM) (Teflabs, Austin, TX, USA). Rhod-2 is supplied in a set of 20 vials containing 50 µg stored at -20°C and protected from the light. The probe solution should be reconstituted

in 50 µL of anhydrous DMSO and then used as soon as possible (within a week, stored at -20°C) to avoid decomposition with subsequent loss of cell loading capacity (Note 2). Rhod 2 is the only synthetic calcium probe that shows some specificity in subcellular trapping (to the mitochondrial matrix). Rhod-2 possesses a delocalized positive charge that favours its accumulation inside the mitochondrial matrix due to the negative mitochondrial inner membrane potential. However, according to the cell model, mislocalization of Rhod-2 in compartments such as cytoplasm, nucleolus may occur, in this case specific protocols had to be designed to take this problem into account.

MitoTracker® green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). MitoTracker® green is purchased in a set of 20 vials containing 50 µg. The probe can be reconstituted in a 1 mM solution stock with DMSO. Store at -20°C and protect from the light (Note 3).

2.3- Recording system

a. Round coverslips: 25 mm (Marienfield, Germany) (Note 4).
b. Attofluor® cell chambers (Thermofisher Scientific, Illkirch, France).

a) Cytosolic Ca^{2+} measurements

Images acquisition are realised using an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX70) equipped with a ×40, UApo/340–1.15 W water-immersion objective (Olympus). Fluorescence micrograph images were captured at 510 nm and at 12-bit resolution by a fast-scan camera cooled-charged device camera (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrics). The source of excitation light was a xenon arc lamp (100W). Fura-PE3 (1 µM) was alternately excited at 345 +/- 15 and 380 +/- 15 nm (table 1) by a computer controlled filter wheel changer (Sutter). Ratios of the resulting images (345/380) were produced every 5 or 10 seconds. For experiments on GFP-expressing cell lines, Fluo-2LR (1 µM) was used, because GFP disturbs Ca^{2+} measurement with Fura. GFP expressing cells (shRNA-transduced cells) are located by their emission of fluorescence at 530 +/- 30 nm for a light excitation at 485 +/- 22 nm (Figure 5). Ca^{2+} changes were evaluated by exciting fluo2LR-loaded cells at 535+/-35 nm, and the emitted fluorescence was measured at 605 +/-50 nm (table 1).
To minimize UV light exposure, 4×4 binning function was used.
Acquisition and analysis software: MetaFluor Fluorescence Ratio Imaging Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)

b) Mitochondrial Ca^{2+} measurements

Images acquisition are realised using a confocal microscope (LSM 510 Meta, Zeiss) with an x63 oil-immersion objective (NA= 1.3). Excitation is produced by a Helium/Neon laser. Acquisition and analysis software: AxioVision (Zeiss).

3- Methods

Carry out all procedures at room temperature unless otherwise specified.

3.1- Cytosolic Ca^{2+} measurements

3.1.1- Cell preparation

Adherent cells were seeded on 25 mm glass coverslips placed in 6 well plates and maintained in culture medium (Note 5) 48 hours before Ca^{2+} measurements (37°C, 5% CO_2, humidified conditions). Depending on the cell type, the seeding is expected to achieve about 60-70% confluence after 48 hours of culture.

For non-adherent cells (lymphocytes), spinning the culture in a 15 mL Falcon tube at 300 g for 5 minutes.

3.1.2- Loading solution

Adherent cells:

1. For 10 coverslips, add 10 µL Fura-PE3 stock solution (1 mM) or 10 µL Fluo-2LR stock solution (1 mM) to 10 µL pluronic acid® F-127 (20% w/v).
2. Vortex the mix solution vigorously.
3. Add 10 mL HBSS.
3. Vortex the probe solution.
4. Remove culture medium from cells and add 1 mL of the probe solution in a well containing a coverslip.
5. Place cells in an incubator at 37°C, 5% CO_2 in humidified conditions during 30 minutes.
6. After loading, wash cells with probes-free HBSS to remove external dye.
8. Mount coverslip with cells in a recording chamber (Attofluor) and add 1 mL of HBSS.
9. Place the recording chamber in an incubator (37°C) for further 15 minutes to allow complete de-esterification of intracellular AM probes.

Non-Adherent cells:

1. Re-suspend the cell pellet in the probe solution (10 mL).
2. Protect from light at room temperature for 30 minutes.
3. Centrifuge at 200 g for 5 minutes and eliminate the supernatant.
4. Re-suspend the cell pellet in free-probe HBSS (1 mL).
5. Mount a glass coverslip in an Attofluor chamber and add 950-975 μL of HBSS.
6. Deposit a volume (25-50 μL) of the cell suspension on the glass coverslip.
7. Wait until all the cells are on the bottom and do not move the Attofluor® cell chamber.

3.1.3- Ca^{2+} measurements

1. Put a drop of de-ionized water on the x40 objective.

2. Position the chamber on the stage of the Olympus inverted epifluorescence microscope.

3. Focus on cells.

4. Using MetaFluor Fluorescence Ratio Imaging Software, delimit an area without fluorescent cell that will be used to subtract the background noise. Draw Regions Of Interest (ROI) around whole cell or inside cells (compartments) where intensity of emitted fluorescence (520 nm, see table 1) will be measured *vs* time. The software displays online the time course of the intensity of emitted fluorescence for each excitation wavelength used (340, 380, 485, 535 nm) and the ratio for Fura-2 experiments (F340/F380nm). Images (and data) can be captured every 5 to 10 seconds according to the kinetics of the events and during 800 to 1200 seconds according to the agonist. Data are imported in Origin Pro (Origin Lab) and graphed. Images of fluorescent cells are pseudo colored using the IMD display mode in MetaFluor. The values of the emitted fluorescence for each cell (F) are normalized to the starting fluorescence (F_0) and reported as F/F_0 (relative $[Ca^{2+}]_{CYT}$). F_{ratio} reflects the intracellular Ca^{2+} concentration changes. Each experiment was repeated at least 3 times, and the average of more than 20 single-cell traces per experiment was analyzed.

When Fura-2 is used, the ratio of 340-nm images over 380-nm images can be converted to spatial calcium concentration field using a calibration equation (*14*):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d[R - R_{min}]/[R_{max} - R] \times F^{380}{}_{max}/F^{380}{}_{min},$$

Where $[Ca^{2+}]_i$ is intracellular calcium concentration, K_d is dissociation constant for Fura-2-calcium binding, R_{min} is the fluorescence ratio measured under absence of calcium, R_{max} is the fluorescence ratio measured under saturating levels of calcium, and $F^{380}{}_{min}$ and $F^{380}{}_{max}$ are

fluorescence intensity fluorescence with 380 nm excitation measured under saturating levels and absence of calcium, respectively.

3.2- Mitochondrial Ca^{2+} measurements

3.2.1- Cell preparation

Cells were plated on a 25 mm coverslip contained in 6 well plates mm dish and maintained in culture medium 48 hours before Ca^{2+} measurements (37°C, 5% CO_2, humidified conditions) (Note 5).

3.2.2- Loading solution

1. For one dish, supplement 1 mL of HBSS with Rhod-2 AM and MitoTracker® green to obtain a final concentration at 3 µM and 200 nM, respectively (Note 6). Add 10 µL of pluronic acid® F-127 (Note 1).
2. Vortex the mix solution briefly (Note 7).
3. Remove culture medium from cells and add the mix of 1 mL HBSS containing probes.
4. For loading, place cells in incubator at 37°C, 5% CO_2 in humidified conditions during 120 minutes.
5. After loading, wash cells with HBSS probes-free to remove any non-specific staining.
6. Mount coverslip with cells in a recording chamber (Attofluor) and add 1 mL of HBSS.
7. Place the recording chamber in an incubator (37°C) for further 15 minutes to allow complete de-esterification of intracellular AM probes.

3.2.3- Ca^{2+} measurements

1. Position the chamber on the stage of the LSM 510 confocal microscope.
2. Focus on cells.
3. Protocol is set up to record images each 5 seconds during 400 seconds.
4. MitoTracker® green and Rhod-2 AM were alternately excited using the 488- and 543-nm lines, respectively, of a krypton-argon laser.
5. The emitted fluorescence (at 516 nm and 581 nm for MitoTracker® green and Rhod-2 AM, respectively) was filtered using a dual bandpass filter set (table 1), collected and analysed using Zeiss software AxioVision. After delimitation of ROI, data are imported in Origin Pro (Origin Lab) and graphed.

4- Notes

1) Pluronic® F-127 is a non-anionic, surfactant polyol (molecular weight approximately 12,500 daltons) that has been found to facilitate the solubilisation of water-insoluble dyes such as the acetoxymethyl (AM) esters of fluorescent ion indicators (fura-2, fluo-2…) in recording media. Appropriate controls should be performed to make certain that it is not altering the membrane properties of the cell. Pluronics have also been shown to overcome Multidrug Resistance (*15-17*). The inhibition of MDR pumps is important to study the effects of CD95 engagement on intracellular Ca^{2+} concentration because we observed that CD95 ligands stimulated the extrusion of fluorescent probes (fluo-2, fura, calcein…) by activating these pumps. In the case of single wavelength probes (fluo-2…), inhibition of the MDR pumps (verapamil, probenecid, Pluronic® F-127) or the use of leak-resistant fluorescent probe revealed the Ca^{2+} responses (Figure 6). Verapamil and probenecid are known to act on Ca^{2+} signalling. We use Fluo2 LR or FuraPE3 we mix vigorously (vortex) with Pluronic® F-127.
2) Wherever possible, prepare and use solutions on the same day. If solutions need to be prepared in advance, store the solution as aliquots in tightly sealed vials at -20°C, protect from light and conserve for up to one month. Avoid freeze-thaw cycles.
3) Store lyophilized solid at -20°C, desiccated and protected from light. As recommended by the provider, in lyophilized form, this reagent is stable for 6 months. Once reconstituted in DMSO, the solution should be stored at -20°C, protected from light, and must be used within 2 weeks. Avoid freeze-thaw cycles.
4) Round coverslips might be sterilised with ethanol before use to avoid cell contamination.
5) Cells were counted to obtain about 60-70% of confluency 48 hours after seeding.
6) Prepare intermediate solutions of Rhod-2 AM and MitoTracker® green by dilution of an aliquot of 10 µL in 90 µL of HBSS.
7) Keep the mix solution protected from light.
8) To avoid a strong background induced by non-specific staining, cells can be gently rinsed one or two times using HBSS probes-free before measurements.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM, INCa and Ligue contre le cancer (comité des Pyrénées Atlantiques).

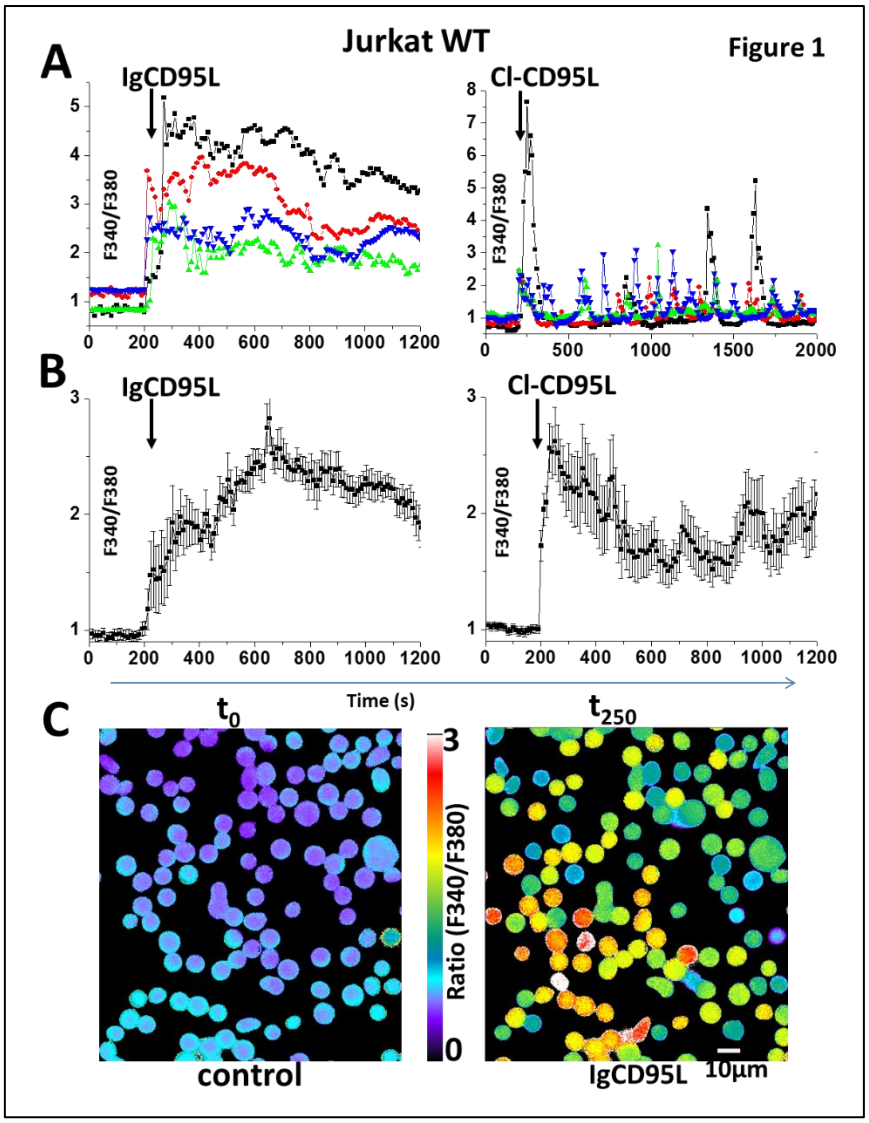
5- References

1. Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling, *Nature* 361, 315–325.

2. Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517–529.
3. Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21
4. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74, 595–636.
5. Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., Hajnóczky, G. (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* 39, 121–132.
6. Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2010) Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol. Cell*, 38, 280–290.
7. Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047–1058.
8. Stewart, T.A., Yapa, K.T., and Monteith, G.R.. (2015) Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 2502–2511.
9. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
10. Khadra, N., Bresson-Bepoldin, L., Chaigne Delalande, B., Penna, A., Cahalan, M.D., Ségui, B., Levade, T., Vacher, A.M., Reiffers, J, Ducret,T., Moreau, J.F., Vacher, P., and Legembre, P. (2011) Identification of a CD95-mediated negative feedback loop that hinders the DISC formation through an Orai1-Ca^{2+}-PKCβ2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19072-19077.
11. Tauzin, S., Chaigne-Delalande, B., Selva, E., Khadra, N., Daburon, S., Contin-Bordes, C., Blanco, P., Le Seyec, J., Ducret, T., Counillon, L. Moreau, J-F., Hofman, P., Vacher, P. and Legembre, P.(2011) The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol* 9:e1001090.
12. Malleter, M., Tauzin, S., Bessede, A., Castellano, R., Goubard, A., Godey, F., Leveque, J., Jezequel, P., Campion, L., Campone, M., Ducret, T., Macgrogan, G., Debure, L., Colette, Y., Vacher, P., and Legembre, P. (2013) CD95L cell surface cleavage triggers a pro-metastatic signalling pathway in triple negative breast cancer. *Cancer Res*, 73, 6711-6721.
13. Schlegel, W., Winiger, B.P., Mollard, P., Vacher, P., Wuarin, F., Zahnd, G.R., Wollheim, C.B., and Dufy, B. (1987) Oscillations of cytosolic Ca^{2+} in pituitary cells due to action potentials. *Nature*, 329, 719-721.
14. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
15. Chen, L., Sha, X., Jiang, X., Chen, Y., Ren, Q., and Fang X. (2013) Pluronic/F127 mixed micelles for the delivery of Docetaxel against Taxol-resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*, 8, 73-84.
16. Chen,Y., Sha, X., Zhang, W., Zhong, W., Fan, Z., Ren, Q., Chen, Y., and Fang, X. (2013) Pluronic mixed micelles overcoming methotrexate multidrug resistance : in vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*, 8, 1463-1476.
17. Alakhova, D.Y., and Kabanov, A.V. (2014) Pluronics and MDR reversal: an update. *Mol Pharm*, 11, 2566-2578.

Table 1: Characteristics of the fluorescent probes used

Probe	Company	References	Staining	Diluent	Storage	Final concentration	λ excitation (nm)	λ emission (nm)
FuraPE3 (AM)	Euromedex	0108-teflabs	Cytosolic Ca^{2+}	DMSO	-20°C	1 µM	340+/-15 / 380+/-15	510+/- 23
Fluo2-LR (AM)	Euromedex	0230-teflabs				1 µM	485+/- 22	530 +/- 30
Fluo2-LR + GFP	Euromedex	0230-teflabs				1 µM	Fluo-2: 535+/-35	Fluo-2: 605 +/-50
							GFP: 485+/- 22	GFP: 530 +/- 30
Mitotracker® green	Invitrogen	M7514	Mitochondria			200 nM	488	516
Rhod2-AM	Invitrogen	R-1244	Mitochondrial Ca^{2+}			3 µM	543	581



<u>Figure 1:</u> $[Ca^{2+}]_{cyt}$ determination in individual Jurkat T lymphocytes using video imaging point out the diversity of the responses in terms of amplitude, duration, and frequency from a cell to another. **A**. Overlay of several individual Ca^{2+} responses to the dodecameric, apoptotic ligand of CD95 (IgCD95L, 100 ng/mL) (left panel) and to the trimeric cleaved CD95L (Cl-CD95L, 100 ng/mL) (right panel). **B.** Mean +/-SD (n = 31) of the Ca^{2+} responses to IgCD95L (left panel) and to Cl-CD95L (right panel). The population average (**B**) masks some important information such as Ca^{2+} oscillations frequency which is increased by cl-CD95L (**A**). **C**. Fluorescence images (Ratio F_{340}/F_{380}) of a field before (0", t_0, left) and after (250", t_{250}, right) IgCD95L (100 ng/mL) application. Grey levels were translated into false colors according to the color scale shown between the two images. This type of images can be used to show the percentage of responding cells (here about 100%). Note the heterogeneity of the amplitudes of the responses (blue to red or white cells) as shown by the graphs in **A**.

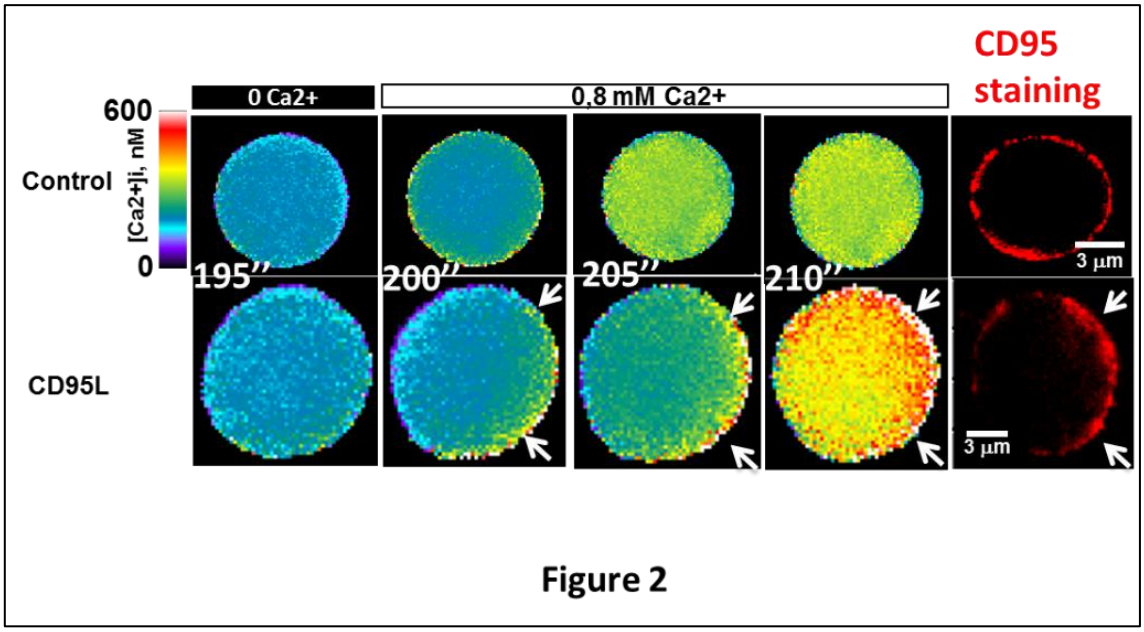
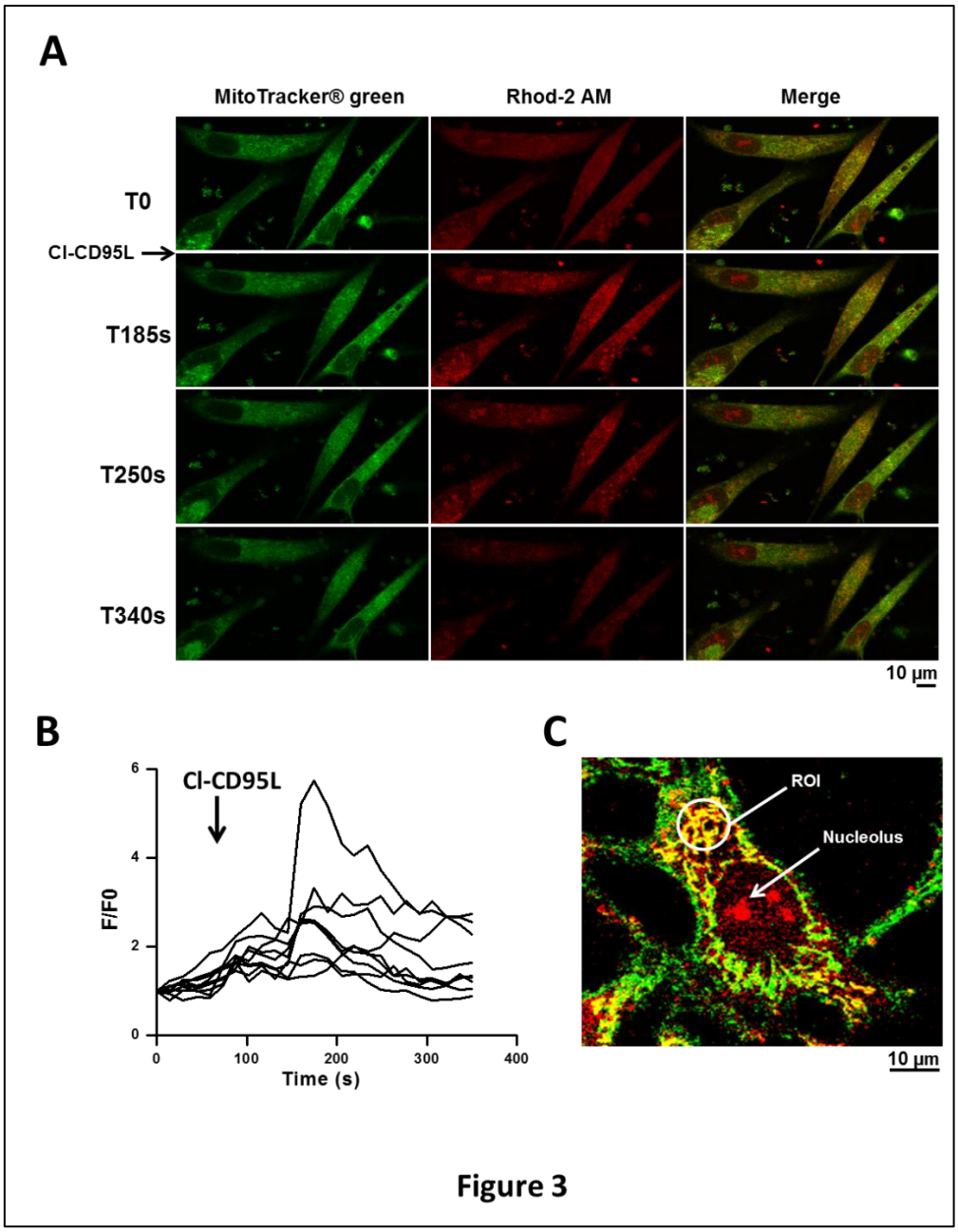


Figure 2

Figure 2: STIM1/Orai1 distribution into the CD95-Cap triggers localized Ca^{2+} entry. In activated PBLs, CD95 was stained and untreated (Control, *Upper*) or treated (CD95L, *Lower*) with 100 ng/mL CD95L at 37°C. CD95 labeling (red) was analyzed using a conventional video-microscopy setup (CD95 staining), and images of the Fura-PE3 fluorescence (F340nm/F380nm) were obtained every 5 seconds and translated into false colors according to the color scale shown on the left. Cells were bathed in a Ca^{2+}-free extracellular medium (black bar), and 0.8 mM Ca^{2+}-containing medium was perfused in the bath (white bar) to visualize Ca^{2+} influx in CD95L-stimulated and unstimulated cells. For each condition, intracellular Ca^{2+} concentration was recorded at different time points. White arrows indicate CD95-Cap and sites of Ca^{2+} influx.



<u>Figure 3:</u> Mitochondrial Ca^{2+} responses to Cl-CD95L in invasive breast cancer cells BT-549. A. Confocal micrographs of BT-549 cells co-loaded with a mitochondrial Ca^{2+} indicator (Rhod-2 AM, red; *center*) and a mitochondrion specific marker (MitoTracker®, green; *left*). Application of Cl-CD95L (100 ng/mL) induces an increase of mitochondrial Ca^{2+} concentration revealed by higher red fluorescence intensity. **B.** Rhod-2 (-AM) fluorescence intensity is quantified by delimiting regions of interest (ROI) containing both Rhod-2 (-AM) and MitoTracker® Green fluorescence. **C**. Example of ROI drawn in a yellow area corresponding to an overlap of Ca^{2+} (red) and mitochondria (green) after Cl-CD95L application on MEF (Mouse Embryonic Fibroblast). Note that Rhod-2 staining can be observed in nucleolus.

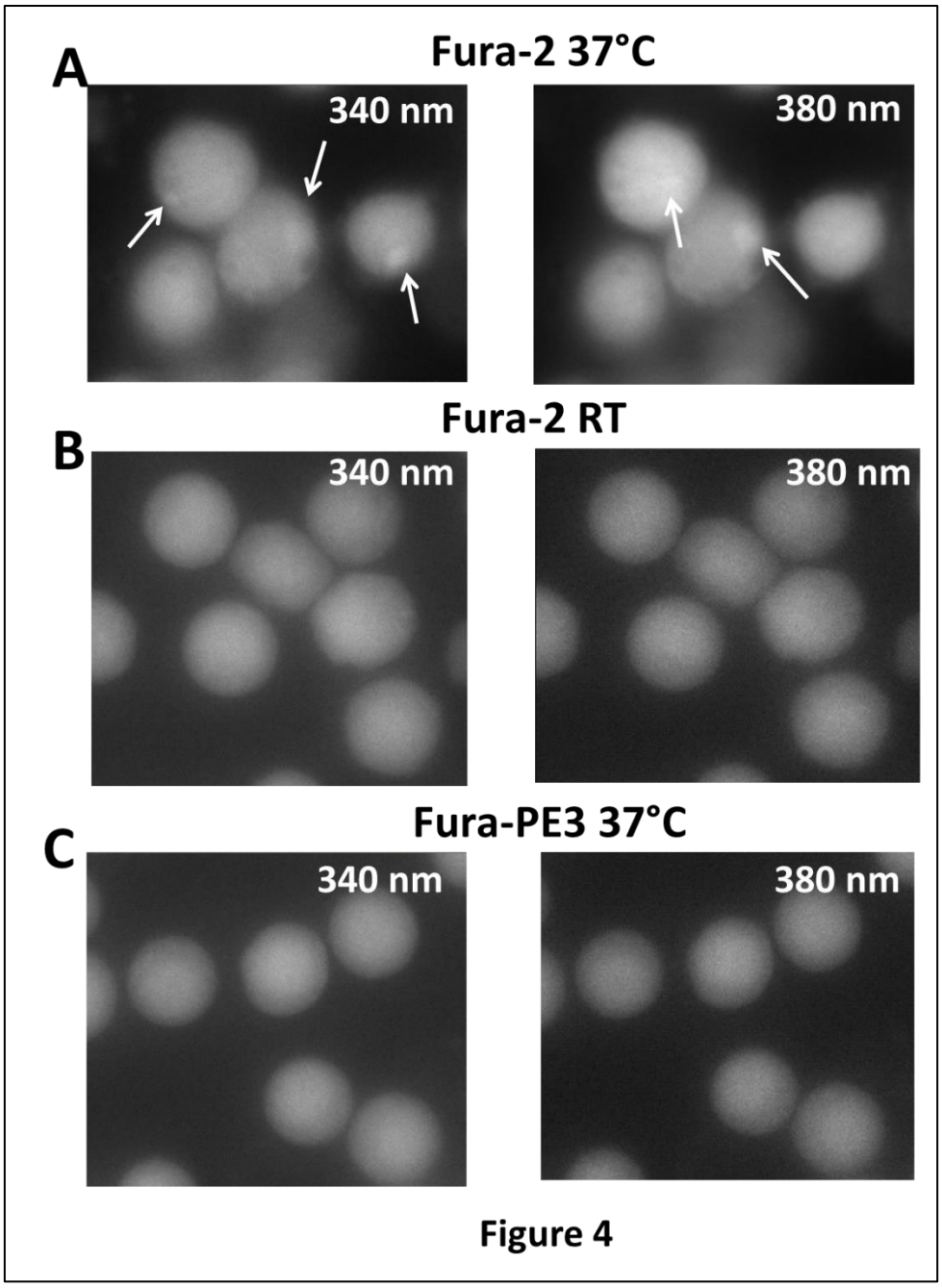
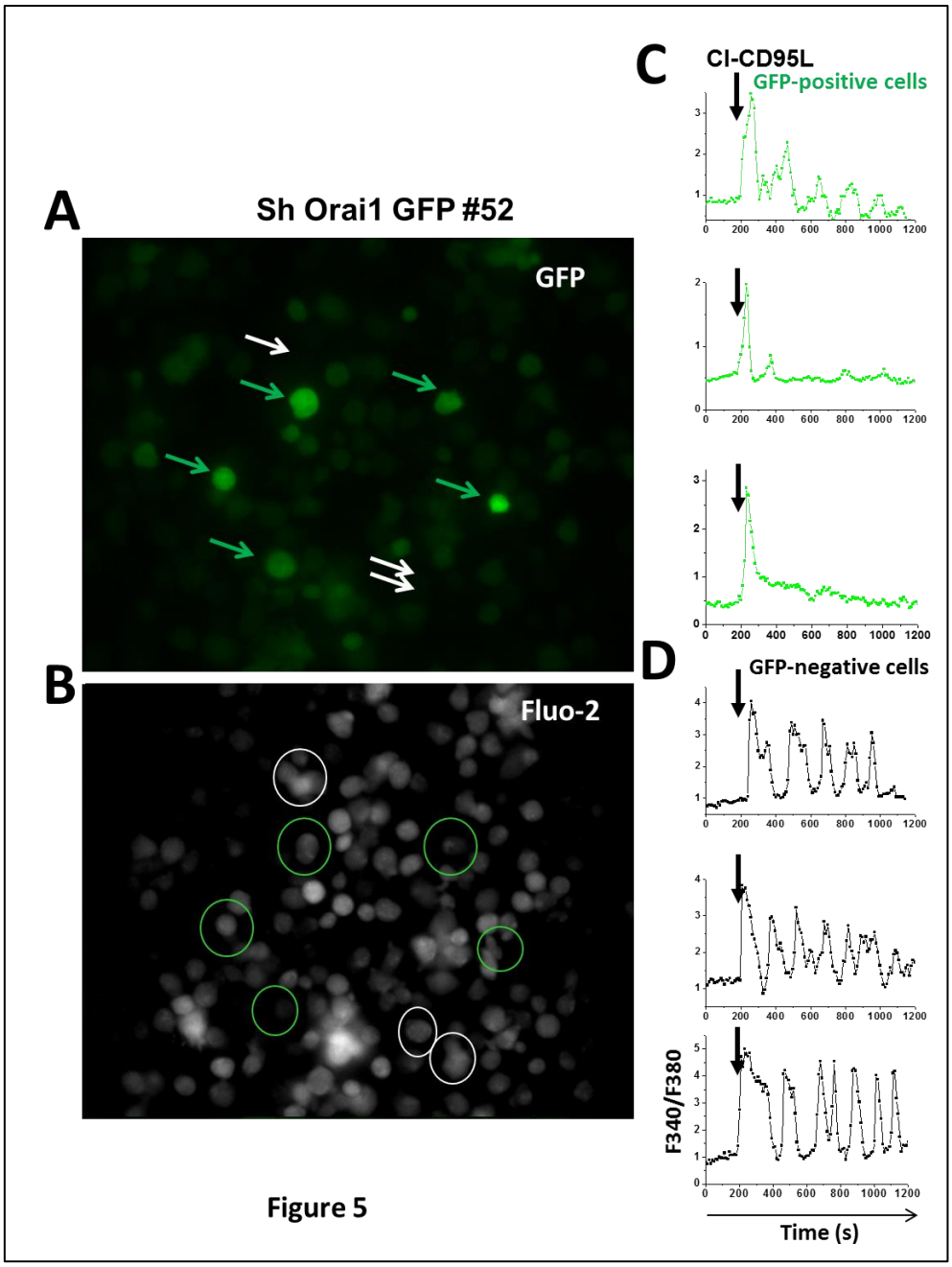
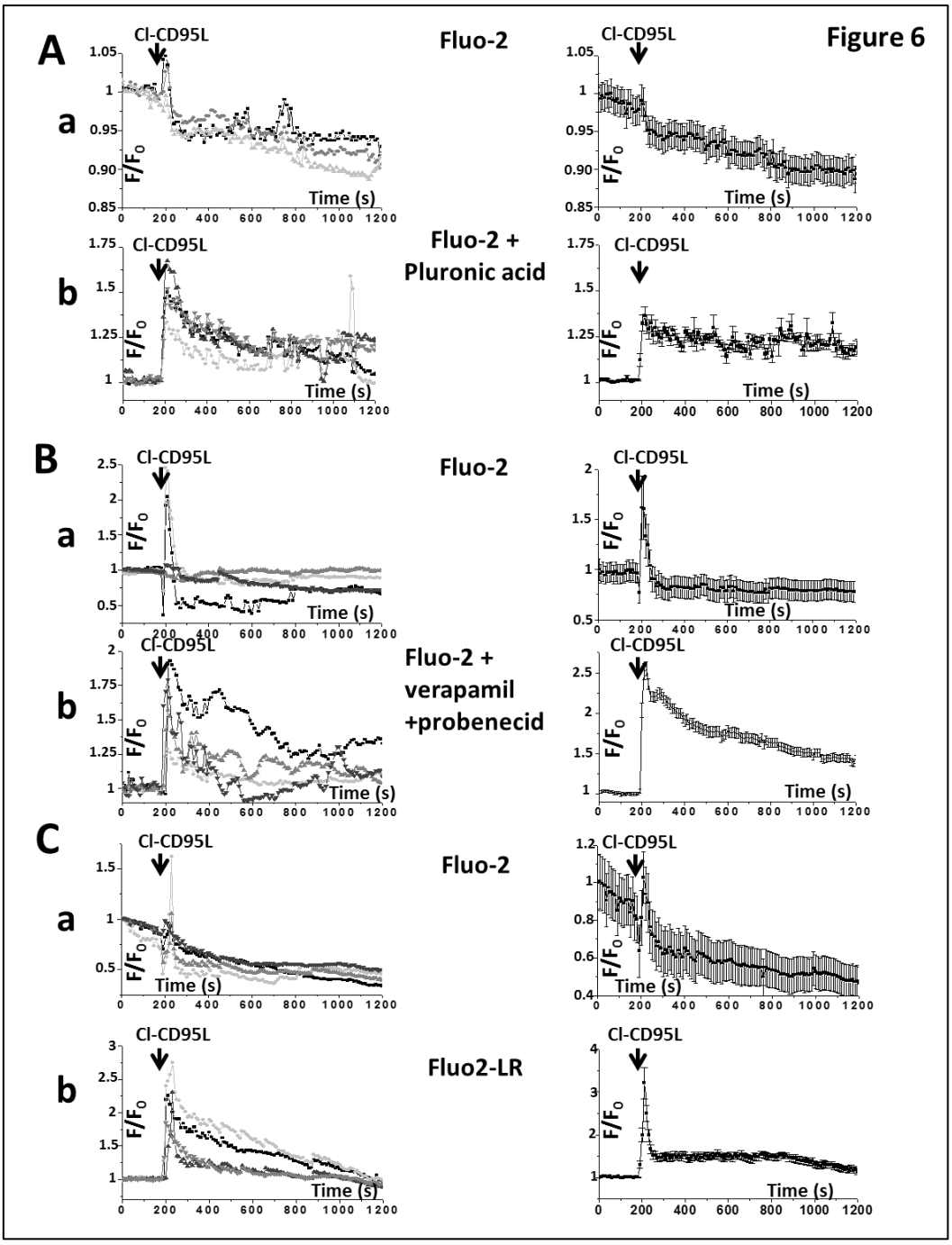


Figure 4: Fluorescence images (grey levels) captured for λ_{exc} = 340 nm (left panels) and λ_{exc} = 380 nm (right panels) of Jurkat T lymphocytes loaded for 30 minutes with 1 µM Fura-2 at 37°C (A), at resting temperature (B), or with 1 µM Fura-PE3 at 37°C (C). Compartmentalization of the fluorescent probe was only observed when cells were loaded with Fura-2 at 37°C. The leak-resistant Fura-2 (Fura-PE3) can be used at 37°C without any artefactual localization of the probe.



<u>Figure 5:</u> Ca^{2+} responses to Cl-CD95L in GFP-positive sh Orai1 and GFP-negative sh Orai1 Jurkat cells. A. Because of the heterogeneity of transduction efficiency from a cell to another, GFP-positive and GFP-negative cells are located (λexc 485 nm, λem 530 nm), regions of interest (ROI) are drawn on GFP-positive cells (green circles) and GFP-negative cells (white circles) Then, fluo-2 fluorescence (**B**) is measured (λexc:535 +/-35 nm, λem:605 +/-50 nm) in ROI and graphed *vs* time (GFP-positive cells, **C**; GFP-negative cells, **D**). Note that the duration of the response to 100 ng/mL Cl-CD95L was shortened in efficiently transduced cells.



<u>Figure 6:</u> Cl-CD95L induces a loss of the fluo2 fluorescent probe by activating Multi Drug Resistant (MDR) pumps in MDA-MB-468 (A), MDA-MB-231 (B) and T47D (C) breast cancer cell lines. Cells were loaded with Fluo2-AM (**A, B, Ca**) or with Fluo2 Leak Resistant (**Cb**). Pluronic acid® F127 (0.02% w/v) (**Ab**) or Probenecid (2.5 mM) + verapamil (10 µM) (**Bb**) were added to the loading solution in order to block MDR pumps and Fluo2 efflux. Left panels: overlay of several time course recordings in different individual cells. Right panels: mean+/-se of more than 60 cells. Cl-CD95L (100 ng/mL) was added at the indicated time (arrow).

Outils pharmacologiques

Lors de nos expérimentations, nous avons utilisé différents agents pharmacologiques, dont les caractéristiques sont présentées dans le ***Tableau 5***.

Liste des agents pharmacologiques utilisés au cours des expérimentations.

Tableau 5 *Liste des agents pharmacologiques utilisés au cours des expérimentations.*

Nom de la drogue	Fonction	Fournisseur
KLs (65kDa)	Protéine recombinante humaine avec le domaine KL1	Sigma Aldrich
KLs (130kDa)	Protéine recombinante humain avec les domaines KL1 et KL2	R&D Systems
Human IGF-1	Protéine recombinante humaine	Miltenyi Biotech
Doxorubicine	Adriamycine (Pfizer), agent intercalant de l'ADN	Pharmacie de l'Institut Bergonié
Gemcitabine	Gemzar (Eli Lilly and Company), anti-métabolite pyrimidique	Pharmacie de l'Institut Bergonié
Docetaxel	Taxotere (Sanofi-Aventis), stabilisateur des microtubules	Sigma Aldrich
ABT-263	Navitoclax, Inhibiteur de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w	Selleckchem pour l'*in vitro*, MedChemExpress pour l'*in vivo*
ABT-737	Inhibiteur de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w	Selleckchem
ABT-199	Inhibiteur de Bcl-2	Selleckchem
A1210477	Inhibiteur de Mcl-1	Selleckchem
QVD-OPh	Inhibiteur des caspases	R&D Systems
Wortmannin	Inhibiteur de la PI3K	Sigma Aldrich
PD98059	Inhibiteur de MEK	Selleckchem
BMS-754807	Inhibiteur d'IGF-1R/récepteur à l'insuline	Selleckchem
Anisomycine	Bloque le translocon en position fermée	Sigma Aldrich
Ionomycine	Ionophore calcique	Sigma Aldrich
Puromycine	Bloque le translocon en position ouverte	Sigma Aldrich
Thapsigargine	Inhibiteur des pompes SERCA	Sigma Aldrich
Larixyl Acetate	Inhibiteur de TRPC6	Santa Cruz Biotechnolocy
U73343	Analogue inactif de U73122 et inhibiteur de TRPC6	Sigma Aldrich
OAG	Activateur des canaux TRPC3-6-7	Sigma Aldrich
Hyp9	Activateur de TRPC6	Sigma Aldrich
Pyr3	Inhibiteur de TRPC3	Calbiochem
CCCP	Protonophore	Sigma Aldrich
DPI	Inhibiteur des NADPH oxydases	Sigma Aldrich
NAC	Inhibe les ROS	Sigma Aldrich

Pour les expériences de vidéomicroscopie sont utilisés : 20nM d'IGF-1, 100nM d'ionomycine, 1µM thapsigargine, 200nM d'anisomycine (30min), 1µM de CCCP, 1µM de larixyl acetate (1h), 50µM d'OAG, 1µM d'U73343 (1h), 50nM de BMS-754807 (24h), 1µM de PD98059 (2h), 1µM de Wortmannin (2h), 1µM Pyr3 (1h), 1mM de NAC et 5µM de DPI.

Lignées cellulaires

Les expériences sont réalisées sur des lignées cellulaires de DDLPS, isolées à partir de fragments de tumeurs récupérés après exérèse, avec consentement éclairé du patient, puis mis en culture à l'Institut Bergonié par l'équipe de F. CHIBON (INSERM U1218) [383]. Leur authentification est réalisée par aCGH et comparaison avec la tumeur d'origine. Aucune expression basale de KL n'est détectée par western blot dans les lignées.

Les lignées de sarcomes sont cultivées dans un milieu de culture RPMI1640+GlutaMAX^{TM}-I (Gibco) auquel est ajouté 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) décomplémenté. La lignée HEK-293T est cultivée en DMEM + GlutaMAX I (Life Technologies) complémenté par 10% de SVF. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 à 4 jours, lorsque les cellules atteignent 80% de confluence. Les cellules sont incubées à 37°C, dans une atmosphère humide enrichie à 5% de CO_2.

Etablissement des modèles cellulaires de surexpression de *KL* par infection lentivirale

- **Extraction des plasmides**

Les bactéries possédant le vecteur contrôle (« vecteur vide », pReceiver-Lv105) ou le même vecteur contenant l'ADNc de *KL (*« vecteur -KL », EX-Z9677-Lv105) sont fournies par Genecopoiea. Le plasmide pReceiver-Lv105 contient des séquences de résistance à l'ampicilline, pour la sélection des bactéries, ainsi qu'à la puromycine, qui permettra la sélection des cellules de DDLPS après l'infection (**Figure 43**).

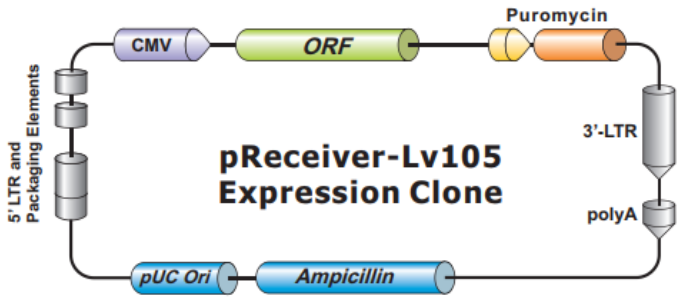


Figure 43 *Schéma du plasmide utilisé pour l'établissement des modèles de surexpression du gène KL*

Les bactéries sont d'abord amplifiées dans un milieu LB avec ampicilline (0,1mg/mL) (réf. A9518, Sigma), dont la composition est la suivante : pour 1L de LB sont préparés 10g Bactotryptone (réf. 211705, BD Biosciences) + 5g BactoYeast (réf. 212750, BD Biosciences) + 10g NaCl (réf. S9625, Sigma) + 2 pastilles NaOH (réf S5881, Sigma) + H2O autoclavée qsp 1L. Les plasmides sont ensuite extraits par Maxiprep (EndoFree® Plasmid Maxi kit, réf. 12362, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

- **Production des particules virales pseudotypées avec la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G)**

La production des particules lentivirales a lieu dans le laboratoire de niveau P3 de l'Institut Bergonié. La veille de la transfection, $4{,}5.10^6$ cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney 293T) sont ensemencées dans du milieu de culture complet (DMEM+10% SVF) sur boîtes de Pétri de 10cm², préalablement recouvertes de poly-L-lysine pour augmenter leur adhérence. Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 30min à 37°C dans du milieu complet contenant 25µM de chloroquine (réf. C6628, Sigma), afin de les perméabiliser. Pour chaque boîte de Pétri, 500µL de solution contenant les vecteurs codant pour l'enveloppe (4µg de pVSVg), pour l'encapsidation (10µg de psPAX2), pReceiver-Lv105 ou EX-Z9677-Lv105 (20µg) et du CaCl2 (0,25M) (réf. 51558, Sigma) sont préparés. Après 2min d'incubation, 500µL de Hepes Buffered Saline solution 2X (réf. 51558, Sigma) sont ajoutés goutte à goutte au mélange de vecteurs sur le vortex. Les vecteurs précipitent pendant 25min à température ambiante avant d'être déposés sur les HEK 293T. Après 6h à 37°C, le milieu est remplacé par du DMEM complémenté par 10% de SVF.

- **Infection des lignées de DDLPS**

Le lendemain, les lignées de DDLPS sont ensemencées en plaques 6 puits à une densité de 10^5 cellules par puits. Dans chaque plaque, un puits contrôle ne recevra pas de particules lentivirales. Le jour suivant, les cellules sont recouvertes de milieu complet contenant 8µg/mL de polybrène (réf. H9268, Sigma). Le surnageant des HEK 293T contenant les particules lentivirales est récupéré, filtré (0,22µm), puis 1mL du filtrat est ajouté dans chaque puits contenant les cellules à infecter. Après incubation sur la nuit à 37°C et deux lavages au PBS (1X) (réf. 14190, Gibco), du milieu de culture complet est ajouté. Trois jours après, le milieu de culture est remplacé par du milieu de sélection (RPMI+ 10% SVF+1µg/mL de puromycine). Ce dernier est renouvelé tous les deux jours, jusqu'à mort complète des cellules du puits témoin

(non infectées). La puromycine est ensuite retirée du milieu de culture et la validation de la surexpression est réalisée par western blot.

Western blot

L'extraction des protéines se fait à 4°C avec un tampon de lyse RIPA (Sigma 0278) auquel sont ajoutés de l'EGTA (1mM), des inhibiteurs de phosphatases : l'orthovanadate (5mM), le fluorure de sodium (10mM) et un cocktail d'anti-protéases (P8340, Sigma). Le dosage des protéines se fait par colorimétrie. La dénaturation des échantillons se fait avec le kit Bolt SDS Sample Buffer + Bolt/NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

La séparation des 20-30µg de protéines totales déposées dans chaque puits se fait avec un gel « Bolt 4-12% Bis-Tris Plus » (#NW04125BOX, Invitrogen) pendant 1h à 150V dans le tampon Bolt MES SDS Running Buffer (#B0002, Life technologies). Après la migration, les protéines sont transférées vers une membrane de PVDF (Polyfluorure de Vinylidène) grâce à une technique d'électro-transfert à sec : l'iBlot2 (Invitrogen, IB24001). La membrane est saturée avec une solution protéique de lait ou BSA (*Bovine Serum Albumine*) à 5% dans du PBST (*Phosphate-Buffered Saline* + 0,1% Tween20) pendant 2h sous agitation. Les anticorps primaires (***Tableau 6***), spécifiques de la protéine d'intérêt, sont ensuite incubés sous agitation légère à 4°C sur la nuit.

Tableau 6 *Présentation des différents anticorps utilisés. (CST=Cell Signaling Technology ; SCBT=Santa Cruz BioTechnology)*

Anticorps primaire et fournisseur	Solution	Dilution
Anti-KL (#PA5-21078, Thermofisher ; #SAB2104815, Sigma Aldrich ; #SAB2105026 Sigma Aldrich)	PBST-Lait 5%	1/1000
Anti-P-IGF1Rβ (Tyr1131)/InsRβ (Tyr1146) (#3021, CST)	PBST-BSA 5%	1/500
Anti-IGF1Rβ (#sc-713, SCBT)	PBST-Lait 5%	1/500
Anti-P-AKT(Ser473) (#4060, CST)	PBST-BSA 5%	1/3000
Anti-AKT (#4685, CST)	PBST-Lait 5%	1/1000
Anti-P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (#9101, CST)	PBST-BSA 5%	1/3000
Anti-ERK1/2 (#9102, CST)	PBST-Lait 5%	1/1000
Anti-P-eIF2α(Ser51) (#3597 CST)	PBST-BSA 5%	1/500
Anti-eIF2α(Ser51) (#sc-11386, SCBT)	PBST-BSA 5%	1/500
Anti-XBP-1s (#12782, CST)	PBST-Lait 5%	1/500

Anti-BiP (#3177, CST)	PBST-Lait 5%	1/3000
calreticulin (#12238, CST)	PBST-Lait 5%	1/3000
Anti-cleaved PARP (Asp214) (#9541, CST)	PBST-Lait 5%	1/500
Anti-CHOP (#sc-793, SCBT)	PBST-Lait 5%	1/500
TRPC6 (#ACC-120, Alomone Labs)	PBST-Lait 5%	1/1000
Anti-Bcl-2 (#sc-783, SCBT)	PBST-Lait 5%	1/500
Anti-Bcl-xL (#2762, CST)	PBST-Lait 5%	1/1000
Anti-Mcl-1 (#sc-819, SCBT)	PBST-Lait 5%	1/500
Anti-actine (#A2066, Sigma)	PBST-Lait 5%	1/5000

Les membranes sont ensuite lavées (PBST, 3x10min) puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire anti-lapin, conjugué à la peroxydase. La détection du signal se fait par chimioluminescence avec le Fusion Fx7 (Thermo Fischer Scientific) et le substrat de la peroxydase ECL West Pico (#34080, Thermo Scientific). Afin de pouvoir hybrider un nouvel anticorps primaire, les membranes sont incubées dans un tampon Glycine-HCl (0,15M ; pH=2) chauffé à 56°C pendant 2x15min. L'abondance des protéines est quantifiée avec le logiciel ImageJ et normalisée par rapport à l'actine.

Test de prolifération cellulaire

Les cellules sont ensemencées en plaques 24 puits à 2500 cellules/puits en 4 réplicats. Le milieu de culture est renouvelé aux jours 0, 3, et 5, jours auxquels les cellules sont lavées, décollées à l'aide d'une solution de trypsine puis re-suspendues dans un volume final de 400µL. Le nombre de cellules dans 100µL est évalué par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences) à partir de leurs caractéristiques morphologiques (dispersion en FSC/SSC). L'acquisition des données est réalisée grâce au logiciel CellQuest Pro (BD FACS Systems, Sunnyvale, CA) puis l'analyse est faite avec les logiciels FlowJo (Tree Star, Celeza GmbH) et GraphPad (La Jolla, CA).

Test de clonogénicité

La clonogénicité est évaluée par la capacité des cellules à former des clones (au moins 50 cellules) à partir d'une seule cellule dans des conditions d'adhérence. Dans ce but, 1000, 500 et 100 cellules sont ensemencées dans des plaques de 6 puits et cultivées 10 jours dans un milieu de culture complet. Les colonies formées sont ensuite fixées avec une solution d'éthanol à 70% puis colorées 5min avec une solution de Crystal Violet 2.3% (Sigma-Aldrich).

Test de viabilité MTT

Les cellules sont ensemencées (5000 cellules/puits) en 5 réplicats, la veille du traitement, en plaques de 96 puits. Après 72h d'incubation avec la doxorubicine ou la gemcitabine, les cellules sont incubées 2h à 37°C, 5% CO_2 avec Le MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, réf. M2128, Sigma) directement ajouté dans le milieu de culture à 0,5mg/mL. Puis, le milieu est retiré et remplacé par 150µL de DMSO (réf. D5879, Sigma). La densité optique (DO) de chaque puits est mesurée aux longueurs d'onde 570 et 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWaveX, Bio-Tek Instruments). Le nombre de cellules vivantes est corrélé à la différence $\Delta DO = DO_{570} - DO_{630}$. La viabilité est exprimée en pourcentages par rapport à la condition contrôle ramenée à 100%.

Cytométrie en flux

L'échantillon est excité à une longueur d'onde unique (488nm) et la fluorescence émise est filtrée : BP 515-545nm pour l'AnnexinV-AlexaFluor488 et l'H_2DCFDA; 564-606nM pour le PI et le TMRM. La population cellulaire est identifiée à l'aide de ses caractéristiques morphologiques (dispersion en FSC/SSC). L'acquisition des données se fait avec le logiciel CellQuestPro. L'analyse des données obtenues est effectuée avec le logiciel FlowJo v10.2 (Tree Star, Celeza GmbH).

- **Marquage TMRM**

Les cellules sont ensemencées (5000 cellules/puits) en triplicats au minimum, la veille du traitement, en plaque de 96 puits. Après incubation avec les agents pharmacologiques, les cellules sont incubées 30min à 37°C, 5% CO_2 avec la sonde TMRM (ester méthylique de tétraméthylrhodamine) (200nM, Fluka), qui se concentre dans les mitochondries dont le potentiel membranaire est intègre. Afin d'éviter l'efflux actif de la sonde hors de la cellule, du vérapamil (20µM, Sigma) est ajouté. Une absence de marquage traduit donc la mort cellulaire ou un stress oxydatif important. Le surnageant est ensuite retiré, et de la trypsine est ajoutée afin de décoller les cellules de leur support. Le surnageant est alors ré-ajouté dans chacun des puits correspondants et la plaque est analysée au cytomètre en faisant l'acquisition d'un volume fixe (25µL).

Afin de déterminer la population de cellules ayant perdu leur potentiel mitochondrial, des cellules non marquées et des contrôles positifs (cellules mortes) marqués sont analysés, en parallèle, au cytomètre.

- **Marquage AnnexinV/PI**

L'Annexine V reconnaît les phosphatidylsérines exposées sur le feuillet externe de la membrane plasmique dès les phases précoces de l'apoptose, tandis que le PI marque l'ADN des cellules devenues perméables. Un double marquage Annexine V/PI traduit donc l'apoptose tardive ou la nécrose des cellules.

Pour cela, 50 000 cellules sont ensemencées en plaques de 12 puits en milieu complet. Le lendemain, les cellules sont prétraitées 1h avec 20µM de QVD-OPh dans les conditions correspondantes. Puis, le milieu est remplacé par celui contenant les drogues +/- QVD-OPh. Les puits contrôles reçoivent les solvants des drogues.

Après 72h d'incubation, les cellules sont marquées avec le kit de marquage Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, V13245) selon les recommandations du fournisseur puis sont analysées par cytométrie en flux (BD FACSCalibur). Les caractéristiques de la dispersion lumineuse sont utilisées pour distinguer la population cellulaire des débris grâce à leur taille et leur granularité (FSC/SSC). Afin de déterminer la population considérée comme positive pour le marquage concerné, des cellules non marquées et des contrôles positifs (cellules mortes) avec un simple marquage sont analysés, en parallèle.

- **Marquage avec la sonde H_2DCFDA**

Pour l'analyse des ROS intracellulaires, 100 000 cellules sont ensemencées en triplicats dans des plaques 6 puits. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu complet contenant la gemcitabine. Après 24h, 36h, 48h ou 56h d'incubation, les cellules sont incubées 45min avec la sonde H_2DCFDA (5µM) et du vérapamil (20µM) à 37°C, 5% de CO_2. Puis, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine, centrifugées avec leur surnageant et re-suspendues dans une solution de PBS 1X contenant 20µM de vérapamil. Les échantillons sont analysés au cytomètre en sélectionnant la population de cellules en FSC/SSC, et la MFI (Median Fluorescence Intensity) en FL1-H des cellules positives pour le marquage est utilisée pour analyser la quantité relative de ROS intracellulaires entre les conditions. Pour cela, elle est normalisée par rapport à la condition contrôle (100%).

- **Analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium**

Pour l'analyse du cycle cellulaire, 100 000 cellules sont ensemencées en triplicats dans des plaques 6 puits. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu complet

contenant 100nM de gemcitabine. Après 24h, 32h ou 48h d'incubation, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine puis lavées deux fois avec une solution de PBS 1X. Après la dernière centrifugation, le culot de cellules est repris dans 300µL de PBS 1X puis 700µL d'éthanol absolu sont ajoutés au goutte à goutte au vortex. Les cellules sont ensuite incubées à -20°C sur la nuit. Pour le marquage avec l'iodure de propidium (PI), la suspension cellulaire subit deux lavages avec une solution de PBS 1X puis le culot est repris avec la solution de marquage FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (F10797, Thermofisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Après 15min d'incubation, au moins 10 000 cellules (après exclusion des doublets) par condition sont analysées par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences).

Suivi du niveau de ROS intracellulaire par vidéomicroscopie

Les cellules sont chargées pendant 30min avec 1µM de H_2DCFDA (Sigma) à 37°C, 5% CO_2. Les cellules sont laissées pendant 30min supplémentaires dans un milieu sans sonde fluorescente. Cette charge à faible concentration (10µM dans la littérature) permet d'éviter une augmentation constante, basale de la fluorescence, liée probablement à une production constitutive de ROS par une surcharge en H_2DCFDA. Ces conditions permettent de suivre la production de ROS dans une seule cellule sans artefact de mesure. La fluorescence émise par la sonde a été mesurée comme dans le cas du Fluo2 en vidéomicroscopie : la sonde est excitée à 485+/-22nm, la fluorescence émise est mesurée à 530+/-30nm avec le même appareillage que celui utilisé pour la mesure du Ca^{2+} intracellulaire. Les conditions de charge utilisées nécessitent l'utilisation d'un appareillage très sensible donc très bien réglé qui permet d'amener la mesure des ROS au même niveau que la mesure du Ca^{2+} intracellulaire.

Marquage de l'activité β-galactosidase

Les cellules sont ensemencées en plaques 12 puits, à 50 000 cellules par puits en triplicats. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu complet contenant la gemcitabine. Après 48h, les cellules sont fixées et marquées avec le kit Senescence β-Galactosidase Staining Kit (#9860, Cell Signaling) conformément aux instructions du fournisseur.

Ensuite, 3 photos par puits sont prises et le nombre de cellules positives au marquage est analysé en fonction d'un seuil déterminé avec le logiciel ImageJ. Dans les conditions traitées avec l'apoptose la plus importante (IB115-KL), au moins 110 cellules sont analysées au total.

In vivo

Le design de l'expérimentation animale a été approuvé par un comité d'éthique (Dossier Apafis : 201702101413419-V4 APAFiS # 9389). Les manipulations ont été réalisées à l'animalerie de Bordeaux à Talence par Marie-Paule ALGEO et Marie-Alix DERIEPPE.

Cinq millions de cellules IB115 sont injectées dans le flanc droit de souris Ragγ2C-/-. Les souris sont réparties en 4 groupes semblables par rapport à la distribution des volumes tumoraux. Les tumeurs sont mesurées trois fois par semaine. Lorsque la moyenne des groupes de traitement atteint 150mm3, les souris sont traitées en même temps soit :

- avec l'ABT-263 dilué dans 60% Phosal50, 30%PEG400 et 10% d'éthanol, par gavage avec un volume de 200µL
- avec la gemcitabine à 30mg/kg, en injection intrapéritonéale, diluée dans une solution de NaCl 0,9%
- avec la combinaison des deux

Pour les conditions contrôles, les souris reçoivent le diluant de l'ABT-263 par gavage et le diluant de la gemcitabine en injection intrapéritonéale. Les calendriers d'administration et les doses sont décrits dans la partie Résultats.

Durant les trois semaines de traitement, le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un caliper électronique et à la fin des cycles, les souris sont sacrifiées pour être pesées. Ensuite, les tumeurs sont extraites et pesées.

Analyses statistiques

Pour tous les résultats sont représentées les moyennes (SD). Exceptés certains résultats préliminaires (précisés dans le texte), toutes les expériences ont été reproduites au moins 3 fois de façon indépendante.

Les tests statistiques sont effectués sur au minimum trois expériences indépendantes avec le logiciel Prism6 v6.01 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA). Afin d'évaluer si la distribution des données obtenues suit la Loi Normale, un test de Shapiro est effectué. Pour étudier la significativité des différences entre deux conditions, un t-test est réalisé si les réplicats suivent la loi Normale. Sinon, un test de Mann-Whitney est appliqué. Les différences observées entre les conditions sont considérées comme significatives (*), très significatives (**) ou hautement significatives (***) respectivement lorsque p (valeur du risque d'erreur) est inférieure à 0.05, 0.01, et 0.001.

RESULTATS

Partie 1 : Rôle de Klotho dans la chimiosensibilisation des liposarcomes dédifférenciés

Afin d'appréhender le rôle de Klotho dans ce modèle de cancer, j'ai établi des modèles de surexpression du gène *KL* codant pour la forme membranaire à partir de lignées de DDLPS isolées à partir de fragments de tumeur de patients mis en culture.

Puis, différents phénotypes tumorigéniques ont été étudiés, en particulier la résistance aux chimiothérapies. Les conséquences des altérations de l'homéostasie calcique induites par Klotho dans ces cellules ont été examinées sur la réponse au traitement.

Une partie des résultats obtenus fait l'objet d'une publication soumise au journal *Cell Death and Differentiation*. L'autre partie est présentée à sa suite.

The anti-ageing protein Klotho sensitizes Dedifferentiated Liposarcoma cells to apoptosis by increasing ER Calcium leak and inhibiting MAPK signaling

Delcroix V.[1,2], Mauduit O.[3,4], Tessier N.[5,4], Montillaud A.[1,2], Ducret T.[2,6], Chibon F.[1,3,7], Ducreux S.[5,4], Van Coppenolle F.[5,4], Vacher P.[1,2]

Authors affiliations

1 INSERM U1218, Bergonié Cancer Institute, F-33076 Bordeaux, France.

2 University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

3 Department of Pathology, Bergonié Cancer Institute, F-33076 Bordeaux, France.

4 University of Lyon, Lyon, Cedex 07, France

5 Univ-Lyon, CarMeN laboratory, Inserm U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Hospital Cardiology, B13 Building, Lyon East, 59 boulevard Pinel, F-69500 Bron, France.

6 INSERM U1045, CRCTB, F-33000 Bordeaux, France

7 Current affiliations: INSERM U1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) and Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, 31037 Toulouse, France

CORRESPONDING AUTHOR : Pierre Vacher (pierre.vacher@inserm.fr)
Inserm U1218, Institut Bergonié, 229 cours de l'Argonne, F-33076 Bordeaux
Phone: +33 556 330425

KEYWORDS: klotho, liposarcoma, calcium, cancer, er stress, translocon, IGF-1, ERK, gemcitabine

RUNNING TITLE: Klotho and Dedifferentiated Liposarcomas

NUMBER OF FIGURES: 6 – **NUMBER OF TABLES:** 0 – **NUMBER OF REFERENCES:** 53

Abstract

Dedifferentiated liposarcomas (DDLPS) are high-grade tumors associated with a poor prognosis and high chemoresistance. Insulin-Like Growth Factor 1-Receptor (IGF-1R) and its downstream signaling are frequently upregulated and hyperactivated in liposarcomas. However, clinical trials with IGF1-R inhibitors have been disappointing in several cancers including sarcomas. Therefore, it is necessary to develop new strategies for inhibiting IGF-1R signaling.

Klotho (KL) was shown to be an aging- and tumor-suppressor by inhibiting IGF-1R. In this work, we investigated the potential of KL as a tool for overcoming therapy resistance in DDLPS. We established a DDLPS cell line, isolated from a patient's tumor, overexpressing *KL*.

First, we confirmed the attenuation of IGF-1-induced signaling in *KL*-overexpressing DDLPS cells. Consistent with a tumor suppressor role, *KL* overexpression also reduced cell proliferation and clonogenicity. Moreover, KL dramatically increased the apoptotic response following long-term treatment with gemcitabine, thapsigargin and ABT-737. Common features of these treatments include protection towards apoptosis conferred by IGF-1R-dependent signaling, and activation of calcium (Ca^{2+})-dependent endoplasmic reticulum (ER) stress.

By monitoring cell death and cytosolic Ca^{2+} responses, we demonstrate that KL sensitizes DDLPS cells to ER stress by increasing reticular Ca^{2+}-leakage through the translocon. This was associated with Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) inhibition and could be mimicked by pretreating cells with inhibitors of IGF-1R or MEK. Therefore, we suggest that KL regulates reticular Ca^{2+}-leakage at least through inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling, resulting in a sensitization of DDLPS cells to reticular stressors like thapsigargin, gemcitabine and ABT-737.

Therefore, KL mechanism of action provides a new therapeutic approach in the management of DDLPS tumors. In addition, KL has a prognostic value for survival of patients and may serve as biomarker for tumor response to gemcitabine-based regimen.

Introduction

The heterogeneous family of soft-tissue sarcomas (STS) encompasses malignant tumors that arise from mesenchymal tissue and account for less than 1% of all cancer cases. The histological and molecular analyses of these tumors allow the identification of numerous histotypes, including liposarcomas (LPS) that display an adipocytic differentiation and are divided into four histological subtypes: well-differentiated, dedifferentiated (DDLPS), myxoid and pleomorphic liposarcomas(1). DDLPS are high-grade tumors, associated with a poor overall patients survival(2) because of metastatic progression (17-30%) and high recurrence rates (41-57%)(3,4). For now, complete surgical resection is the mainstay of therapy for LPS patients. Due to the resistance of these tumors towards standard chemotherapies(5), patients affected by advanced, unresectable or metastatic DDLPS receive adriamycin- or gemcitabine-based regimens as palliative treatments. Molecular approaches have initiated the development of targeted therapies like pazopanib for metastatic STS excepting LPS (6). Further therapeutic strategies are still needed and biomarkers of response are essential for managing DDLPS tumors.

One of the altered pathways that is subject to targeted therapy is Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF-1R) signaling. Indeed, IGF-1R is upregulated in sarcoma tumors compared to normal tissue(7) and is associated with poor overall(8) and metastasis-free survival(8,9). Moreover, its downstream effectors p-AKT and p-ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) were proposed as biomarkers for local recurrence(10). Increased expression of IGF-Binding Protein 7 (IGFBP7), which is implicated in cell migration and invasion, is also associated with a higher metastatic risk(11). In addition, serum levels of IGFBP7 are higher in STS patients compared to healthy controls, and especially in LPS patients. Both IGF-1 and IGF-2 mRNA(12) but also IGF-1R(13) are upregulated in LPS compared to adipose tissue. Considering the importance of insulin/IGF-1 signaling in adipose tissue homeostasis(14) and in oncogenesis(15), IGF-1R inhibitors are attractive for LPS therapy. A drug synergistic screen highlighted the combined inhibition of IGF-1R and Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) as a promising strategy for DDLPS(16). However, IGF-1R targeted therapies have been disappointing in clinical trials(17), even in osteosarcoma and STS(18). So, new strategies for inhibition of insulin/IGF-1 signaling are still needed as monotherapy or in combination with other drugs to overcome resistance.

KL (klotho) was first discovered in mice mutated for this gene that display multiple ageing-like phenotypes and die prematurely(19). Overexpression of kl in mice increases their lifespan up to 19-30% (20). KL encodes a transmembrane protein whose extracellular domain can be shed by secretases and act as a soluble hormone(21). Alternative splicing of the gene can also produce a soluble form of the protein (KLs) that will be directly secreted into the extracellular environment(22). The transmembrane protein is an obligatory co-factor for FGF23 and so, has a crucial role in normal renal function, phosphate and calcium (Ca^{2+}) homeostasis(23). In addition to that, membrane bound and KLs exhibit anti-ageing properties mainly by inhibiting insulin/IGF-1 signaling and reducing oxidative stress(20). Interestingly, kl knockout in mice results in the absence of adipose tissue(19). Indeed, Klotho regulates proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells(24).

Numerous studies have highlighted KL as a gene frequently downregulated in cancer (gliomas, breast, colorectal, lung cancers…). KL exerts a tumor suppressive effect mainly through inhibition of IGF-1 signaling(25,26). In vivo, injection of KLs into mice(27–29) or administration of rosiglitazone, which restores KLs secretion in the tumor microenvironment(30), reduce tumor aggressiveness.

Considering its inhibitory effect on IGF-1R and downstream effectors in other cancer models, we investigated in a DDLPS cell line the effect of KL overexpression on IGF-1 signaling and its potential impact on tumoral phenotypes, especially chemoresistance. Next, we identified the molecular targets of KL and highlighted a novel potential therapeutic approach for the management of DDLPS, relying on the disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis combined with endoplasmic reticulum (ER) stressors. Finally, we examined the clinical relevance of KL in terms of survival for LPS patients.

Results

1) In the DDLPS cell line, Klotho reduces IGF-1R-dependent signaling

To assess the cellular role of Kotho in high-grade liposarcomas, we established a DDLPS cell line stably expressing KL (IB115-KL) (Figure 1A). No basal expression of KL was detected by western blotting in the control cell line (IB115-empty vector). Then, we investigated whether Klotho inhibits IGF-1 signaling in these cells.

Fixation of the ligand IGF-1 on its receptor induces IGF-1R auto-phosphorylation and activates two major pathways: the Ras-Raf-mitogen activated protein kinase (MEK)-ERK (MAPKs) pathway and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway. In addition, it also promotes an intracellular Ca^{2+}-response whose effectors remain to be clearly elucidated but include PI3K(31,32) and MEK activity (Supplemental Figure 1A).

First, in order to confirm the putative inhibitory effect of Klotho on IGF-1R-dependent signaling in DDLPS cells, activation of AKT and ERK1/2 during IGF-1 stimulation was analyzed by western blotting (Figure 1B). In contrast with previously published work on breast cancer cells(33), no difference regarding IGF-1R auto-phosphorylation and no reproducible AKT inhibition were observed. However, an effect of Klotho on the other phosphorylated sites of IGF-1R is not excluded and KL-overexpressing cells exhibit a reduced ERK1/2 phosphorylation during IGF-1 stimulation.

Then, we studied the Ca^{2+}-response to IGF-1 in both cell lines (Figure 1C). Whereas control cells responded by large Ca^{2+} oscillations, only rare and small Ca^{2+} transients were obtained in KL-overexpressing cells. Pretreating the control cell line with BMS-754807, a specific inhibitor of IGF-1R/insulin receptor (Supplemental Figure 1B), mimicked the response profile of IB115-KL cells.

This demonstrates that Klotho abrogates IGF-1-induced Ca^{2+}-response. So, in addition to ERK1/2, Klotho might inhibit PI3K signaling, probably independently of AKT activation.

2) KL overexpression in a DDLPS cell line decreases its tumorigenic phenotypes.

Since Klotho affects the IGF-1R pathway in DDLPS cells, we investigated the effect of its overexpression on several tumoral phenotypes modulated by IGF-1R, including cell proliferation, clonogenicity and chemoresistance.

On one hand, KL overexpression significantly decreased cell proliferation (Figure 2A) and clonogenicity (Figure 2B), thus confirming a tumor suppressor role. On the other hand, the main cytotoxic molecules used in chemotherapy regimens for LPS patients were screened (Figure 2C-E) and cell death was assessed after 72h incubation using TMRM-staining, which allows discrimination of cells that lost their mitochondrial electric potential. For doxorubicin, whose auto-fluorescence impairs TMRM detection, cell viability was estimated by a MTT assay. No relevant difference between the two cell lines was observed with doxorubicin (Figure 2C) and docetaxel (Figure 2D). In contrast, KL overexpression significantly sensitized to gemcitabine-induced cell death (Figure 2E). These data were confirmed with a dual AnnexinV/PI staining (Supplemental Figure 2).

This observation is consistent with previous work showing that IGF-1 signaling protects cells from gemcitabine-induced cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma(34). It is worth noting that IGF-1 signaling is also well-known for protecting cells from ER stress-induced apoptosis by increasing the adaptive capacity of ER(35). ER stress was already implicated in resistance to gemcitabine(36,37). Therefore, we tested the hypothesis that, by inhibiting IGF-1 signaling, Klotho could sensitize DDLPS cells to ER stress-inducing agents. On that purpose, DDLPS cell lines were incubated with thapsigargin (TG), an inhibitor of reticular Ca+-ATPase (SERCA) pumps (Figure 2F). TMRM-staining demonstrates that Klotho dramatically sensitizes DDLPS cells to TG-induced cell death. Similar results were obtained with ABT-737, a BH3-mimetic that inhibits anti-apoptotic proteins and consequently increases Ca^{2+} transfer from ER to mitochondria, thus reducing ER Ca^{2+} content(38) (Figure 2G).

These results highlight a specific role of Klotho in gemcitabine and ER-stress-induced apoptosis in DDLPS cells. In order to confirm IGF-1R implication in resistance to apoptosis, control cell line was incubated with sub-lethal concentrations of BMS-754807 (Figure 2H-I).

IGF-1R inhibition significantly increased cell death caused by TG (Figure 2H) or gemcitabine (Figure 2I) in a dose-dependent manner.

These data confirm that IGF-1R signaling, which is antagonized by Klotho, promotes DDLPS cells survival during TG and gemcitabine treatment. However, since IGF-1R auto-phosphorylation and AKT activation are not inhibited by KL overexpression, the downstream mechanisms and effectors of Klotho-mediated sensitization to apoptosis remain to be clearly identified. We hypothesized that all this might rely on the cellular process that connects gemcitabine and TG treatments and is modulated by IGF-1: ER stress.

3) KL-overexpression sensitizes DDLPS to ER stress by disrupting intracellular Ca^{2+} homeostasis.

Long-term exposition to TG induces ER stress and activation of the Unfolded Protein Response (UPR), which encompasses several pathways that activate both cell death and survival mechanisms. The balance between these pathways determines cell fate. In pancreatic cancer, actors of the UPR are activated by gemcitabine and some of them, especially XBP-1, are implicated in chemoresistance(36,37).

Western blot analysis of the activation of several arms of the UPR (Figure 3A) confirmed that gemcitabine treatment activates ER stress signaling in IB115 cell line, although it has only a modest effect on the expression of the chaperone protein GRP78/BiP (Binding immuglobulin Protein), which is a marker of ER stress. In contrast, Klotho enhances BiP expression, even in resting conditions with around a 4-fold increase, suggesting either a basal reticular stress in these cells or an effect related to the Ca^{2+}-binding activity of BiP in the lumen of the ER.

Interestingly, during TG treatment, KL overexpression reduces XBP-1 splicing but enhances eIF2α activation and the subsequent pro-apoptotic induction of CHOP, an observation that is consistent with increased apoptosis and reduced IGF-1 signaling(39). With gemcitabine, this effect of Klotho on eIF2α-dependent signaling is also observed, while detection of spliced XBP-1 here rather reflects a more intense ER stress. Increased cell death in KL-overexpressing cells is illustrated by higher PARP cleavage (Figure 3A).

Enhanced ER stress in IB115-KL cells might originate from a depletion of reticular Ca^{2+}. To point out for a putative effect of KL expression on reticular Ca^{2+} content, we monitored variations of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]$cyt) in cells bathed in a Ca^{2+}-free medium and

applied TG (Figure 3B) or ionomycin, a Ca^{2+} ionophore (Figure 3C). Strikingly, the Ca^{2+}-release following TG treatment was greatly increased in KL-overexpressing cells, as the subsequent capacitive Ca^{2+}-entry (Figure 3B), whereas the Ca^{2+}-response to ionomycin was similar in both cell lines. These data suggest an enhanced reticular Ca^{2+}-leak in KL-overexpressing cells rather than an effect on the size of Ca^{2+} stores.

Next, we investigated the effect of gemcitabine on reticular Ca^{2+}-content of IB115-empty vector cells (Figure 3D-E). Intracellular Ca2+-mobilization is increased in a dose-dependent manner after TG addition (Figure 3D) but no significant difference is observed with ionomycin (Figure 3E). So, gemcitabine-induced ER stress is associated with increased Ca2+-leak at the reticulum.

To conclude, TG application revealed that Klotho promote a constitutive reticular Ca^{2+}-leakage. This probably contributes to the greater sensitivity to ER stressors such as TG, ABT-737 or gemcitabine, resulting in higher CHOP induction and cell death.

4) In DDLPS cells, Klotho promotes reticular Ca^{2+} leakage and apoptosis by opening the translocon.

The major effector of reticular Ca^{2+}-leak is the translocon (TLC)(40), a proteic complex that allows translocation of nascent polypeptides into the ER lumen for elongation and maturation. When the polypeptidic chain is released, Ca2+ leaks through the pore of the TLC, which is at that time in an open-state for Ca^{2+}. Puromycin and anisomycin are antibiotics that inhibit protein synthesis but, respectively, open and close the TLC.

First, we studied the Ca^{2+}-response evoked by puromycin in control and KL-overexpressing cells, bathed in a Ca^{2+}-free medium. Almost no effect was observed in the IB115-empty vector cell line (Figure 4A), whereas IB115-KL cells displayed a huge, transient increase in $[Ca^{2+}]$cyt followed by Ca^{2+}-oscillations (Figure 4B). These were drastically reduced by anisomycin pretreatment (Figure 4C). TLC closure by anisomycin significantly reduced the TG-induced Ca^{2+}-release (Figure 4D), thereby confirming that TLC is implicated in basal reticular Ca^{2+}-leakage. In addition, puromycin triggered a cytosolic Ca^{2+}-response in IB115-empty vector cells pretreated with gemcitabine (Figure 4E). This demonstrates that gemcitabine-induced Ca^{2+}-leakage is mediated at least in part by opening the TLC.

Anisomycin significantly reduced death rates of IB115-KL cells after 72h incubation with TG (Figure 4F) or gemcitabine (Figure 4G). The protective effect towards gemcitabine in

both cell lines was not due to protein synthesis inhibition because puromycin did the opposite and was counteracted by anisomycin on wild-type IB115 cell line (Supplemental Figure 3A). Moreover, long-term treatment with anisomycin did not affect KL-overexpression (Supplemental Figure 3B). Furthermore, anisomycin reduced BiP expression, but not the other reticular chaperone protein calreticulin, and prevented the induction of BiP expression during gemcitabine treatment (Supplemental Figure 3B). To conclude, anisomycin reduces ER stress by limiting the TLC-mediated Ca^{2+}-leakage induced by gemcitabine and enhanced by Klotho.

Altogether, these results demonstrate that in KL-overexpressing cells, a higher proportion of TLCs is in an open-state. This contributes to the reticular Ca^{2+} leakage revealed by TG treatment and aggravates gemcitabine-induced TLC opening, resulting in reticular Ca^{2+}-depletion (Supplemental Figure 3C) and apoptosis.

We next investigated which pathway of IGF-1 signaling, inhibited by Klotho, is implicated in resistance to ER stressors and addressed its impact on reticular Ca^{2+}-leakage.

5) Klotho regulates drug sensitivity and reticular Ca^{2+}-leakage by inhibiting ERK1/2 signaling

Two pathways of the IGF-1R signaling, ras/raf/MEK/ERK and PI3K/AKT, were shown to play a role in resistance to gemcitabine and ER stress. Since Klotho inhibits IGF-1-induced Ca^{2+}-response (dependent on PI3K, see Supplemental Figure 1A) and ERK1/2 activation, we have studied the phosphorylation status of AKT and ERK1/2 in response after incubation with TG and gemcitabine (Figure 5A). AKT was de-phosphorylated and only slightly phosphorylated after TG and gemcitabine treatments, respectively. In contrast, ERK1/2 is phosphorylated in control cells after each treatment, but this activation is inhibited in KL-overexpressing cells, suggesting that ERK1/2 but not AKT is implicated in resistance to TG and gemcitabine.

This was confirmed with the use of PI3K (Wortmannin) and MEK (PD98059) inhibitors (Supplemental Figure 4). Wortmannin pretreatment had only a slight effect on TG-induced cell death of IB115-empty vector cells (Figure 5B), and had no significant effect on apoptosis induced by gemcitabine (Figure 5C). By contrast, PD98059 significantly potentiated the apoptotic response to TG and gemcitabine (Figures 5B-C). These results altogether demonstrate that in the DDLPS cell line, ERK1/2 but not AKT exerts a relevant pro-survival activity against ER stressors and is inhibited by Klotho.

Finally, we addressed the consequence of IGF-1R and MEK inhibition on reticular Ca2+-leakage. First, pretreatment of control cells with BMS-754807 (Figure 5D) or PD98059 (Figure 5E) restored the reticular Ca^{2+}-leakage induced by puromycin and observed in IB115-KL cells. Then, both inhibitors mimicked the effect of Klotho on TG-induced Ca^{2+}-response (Figure 5F) without affecting ER Ca^{2+}-content (Supplemental Figure 5). Therefore, IGF-1R and more precisely ERK inhibition is at least one mechanism by which Klotho promotes reticular Ca^{2+}-leakage through the TLC and so, sensitizes DDLPS cells to ER stressors that act by releasing Ca^{2+} from reticular stores such as TG, gemcitabine and ABT-737.

This novel mechanism highlights a new potential therapeutic strategy for the management of LPS and raises the question of the clinical significance of KL expression for the survival of LPS patients.

6) KL expression is altered in DDLPS tumors and has a prognostic value for liposarcoma patients

Since KL is expressed in normal adipose tissue(41) and has tumor suppressive features on DDLPS, particularly by inhibiting MAPK signaling, we investigated whether its expression is altered in DDLPS tumors. For that purpose, we used free publicly available data from GENT database, which provides processing and normalization of data sets produced by different laboratories (Figure 6A). This highlighted that KL is significantly downregulated ($p<0.001$) in the 61 DDLPS samples (GSE21050) analyzed by gene expression microarray as compared to the 49 samples of normal adipose tissue (GSE13506).

We next examined whether KL expression has a clinical relevance in terms of survival for LPS patients. Analysis by the Bioprofiling database of 137 primary human LPS samples profiled on gene expression microarrays (GSE30929) revealed that a lower expression of KL is significantly associated ($p=0.0129$) with a poorer overall survival (Figure 6B).

On one hand, these results show that KL expression is altered in DDLPS tumors, suggesting that loss of its expression could be a selective advantage for tumor development. On the other hand, KL expression has a prognostic value for patients' survival, thereby turning Klotho into a potential clinical biomarker in high-grade LPS.

Discussion

In this work, we tested the relevance of Klotho as a tool for inhibiting IGF-1R in DDLPS cells and its impact on chemoresistance. To do so, we established a DDLPS cell line, isolated from a patient's tumor, overexpressing KL. We confirmed its inhibitory action on IGF-1-induced Ca^{2+}-signaling and ERK1/2 activation.

Analysis of tumoral phenotypes highlighted a major effect of Klotho on drug sensitivity and on Ca2+ homeostasis. Because Ca^{2+} signaling is involved in several hallmarks of cancer, Ca^{2+} remodeling in cancer cells is a research field of growing interest(42). Here, we demonstrate for the first time that KL expression increases reticular Ca^{2+}-leakage by opening the TLC. This effect on the TLC is supported by the compensatory upregulation of BiP in IB115-KL cells, because BiP interacts with the TLC complex and by this way limits Ca^{2+}-leakage through the pore(43). However, to our knowledge, the link between the permeability of the TLC to Ca^{2+} and IGF-1R or ERK1/2 activity is completely unknown. This totally new and unexpected mechanism will require further investigations

The constitutive Ca^{2+}-leakage confers to the DDLPS cells overexpressing KL a greater susceptibility to apoptosis mediated by the ER-stressors such as thapsigargin (TG), gemcitabine and ABT-737. This sensitization to ER stress-induced apoptosis can also be related to a differential activation of arms of the UPR. Indeed, we observed in KL-overexpressing cells a greater induction of CHOP that promotes transcription of pro-apoptotic genes and aggravates reticular Ca^{2+}-leakage, and a reduced XBP-1 splicing, which normally leads to restoration of ER function and supports cell survival.

These results are in conflict with previous work showing that Klotho protects from ER stress(44). However, KL-overexpressing DDLPS cells share interesting similarities with dwarf fibroblasts, such as increased sensitivity to TG-induced apoptosis, reduced splicing of XBP-1 and preserved activation of eIF2α during TG treatment(39). These fibroblasts were isolated from a murine longevity model called snell dwarf mice that bear a homozygous mutation in the gene encoding Pit-1, resulting in several deficiencies in growth hormones including IGF-1. Indeed, insulin/IGF-1 signaling inhibition is a mechanism shared by numerous animal longevity models including KL-overexpressing mice(20,45). Moreover, IGF-1 signaling was reported as a cytoprotective pathway against canonical ER stress(35,46), but also against gemcitabine(34) and ABT-737 (ref. 47). All these observations are in line with our results showing a potentiated

apoptotic response to ER stressors mediated by inhibition of IGF-1-dependent signaling, in DDPLS cells overexpressing KL. Therefore, the role of Klotho on ER stress might be dependent on the cellular context. Discrepancies between results might also arise from the fact that many studies overexpress the murine KL protein, which is not identical to human KL and could differ in terms of interactions with human proteic partners.

Inhibition of IGF1-R and MEK mimicked the effect of Klotho on Ca^{2+} homeostasis and sensitized to TG- and gemcitabine-induced cell death. Actually, there are numerous crosstalks between MAPK signaling and ER stress(48). Indeed, MEK-ERK pathway promotes cell survival during ER stress by increasing expression of BiP, of the anti-apoptotic protein Mcl-1, by inhibiting caspase-4 activation, and by inducing cell cycle arrest. So, the inhibition of ERK1/2 mediated by Klotho reduces its protective effect. Moreover, ER stress signaling can also directly activate ERK1/2. IRE-1 activation can stimulate ERK1/2 through an unknown mechanism. Reduced XBP-1 splicing in KL-overexpressing cells, suggesting a reduced IRE-1 activation, can be involved in attenuated ERK1/2 activation and so, in increased cell death. In addition, BiP can be translocated to plasma membrane and activate the signaling cascade Ras-Raf-MEK-ERK. So, the fact that, despite enhanced ER stress, ERK1/2 is less activated in KL-overexpressing cells suggests that Klotho may act through additional pathways in parallel to IGF-1R in order to avoid hyperactivation of MAPK signaling. Considering that Ca2+ and reactive oxygen species can modulate ERK1/2 activity and that Klotho regulate both, this provides new avenues for investigation.

Klotho is a regulator of pathways that are commonly altered in LPS as in other cancers, such as Wnt, TGFβ and FGF(26). Its use in the therapeutic management of DDLPS is thus probably not restricted to IGF-1R inhibition. Other benefits that could arise from increased KL expression deserve to be evaluated. Indeed, we reported that KL expression has a prognostic value in terms of overall survival for LPS patients. Its expression is critical for adipose tissue homeostasis but is altered in DDLPS tumors, probably by epigenetic regulations as in several other cancers(49,50). Loss of KL expression may represent a selective advantage for tumor development.

For the first time, we highlighted a role for Klotho in soft-tissue sarcomas. Combining Klotho's mechanism of action and ER stressors may be an alternative for DDLPS patients care. Indeed, LPS frequently overexpress SERCA2 and calreticulin(51,52). Consequently, LPS tumors are sensitive to ER stressors(51). By enhancing Ca^{2+}-leakage-mediated ER stress,

Klotho could increase calreticulin exposure at the surface of tumor cells and so, facilitate immunogenic cell death. Considering the emerging improvements in immunotherapy, this question will certainly be addressed in the future.

Materials and Methods

1) Chemicals

Concerning chemotherapies, doxorubicin (Adriamycin; Pfizer) and gemcitabine (Gemzar; Eli Lilly and Company) were obtained from the pharmacy of the Bergonié Institute (Bordeaux). Docetaxel (Taxotere; Sanofi-Aventis) was obtained from Sigma-Aldrich. ABT-737 was purchased from Selleckchem.

About the other chemicals, thapsigargin, puromycin, anisomycin, ionomycin and Wortmannin were from Sigma-Aldrich. BMS-754807 and PD98059 were purchased from Selleckchem. Human IGF1 was from Miltenyi Biotech. QVD-OPh was purchased from R&D Systems.

2) Cell Lines

The dedifferentiated liposarcoma cell line IB115 was a generous gift from F. Chibon (INSERM U1218, Bergonié Cancer Institute, Bordeaux) and was established as previously described [384]. Authentification of this cell line was realized by CGH and compared with the corresponding original tumor. IB115 cells were cultured in RPMI 1640 + GlutaMAX I (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS). HEK-293T cell line was cultured in DMEM + GlutaMAX I (Life Technologies) supplemented with 10% FBS. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

IB115 cells were infected with a lentiviral vector containing the cDNA sequence of *KL* under the control of CMV promoter (EX-Z9677-Lv105, GeneCopoeia). The control cell line was established with lentiviral transduction of an empty vector (pReceiver-Lv105, GeneCopoeia). VSV-G-pseudotyped lentiviral particles were produced by co-transfection of HEK293T cells with previous vectors and the compatible packaging plasmids psPAX2 and pVSVg. Cell lines were incubated overnight with lentiviral supernatants in presence of 8 µg/ml polybrene (Sigma). Stably transduced cells were selected with addition of puromycin (1µg/mL, Sigma) into culture medium. After effective cell selection, puromycin was removed from culture medium. Then, *KL* overexpression was verified by western blotting.

3) Western Blot

For IGF-1 stimulation, cells were harvested overnight before IGF-1 addition into FBS-free culture medium. For protein extraction, cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed for 30 minutes at 4°C in RIPA lysis and extraction buffer (Sigma) supplemented with a protease/phosphatase inhibitor cocktail (Sigma), 5mM sodium orthovanadate (New England Biolabs), 1mM EGTA and 10mM sodium fluoride (Sigma). Lysates were pelleted 10min at 17 000 x g, 4°C and supernatants were collected for protein quantitation (DC protein assay kit, Biorad). After denaturation, 25µg total proteins of each sample were separated by SDS-PAGE. After transfer onto a PVDF membrane using a dry transfer system (iBlot2, Thermofischer), membranes were blocked in a protein carrier solution (5% Bovine Serum Albumin or non-fat dry milk in PBS-Tween 0.1%) and then incubated with the primary antibody at 4°C overnight. Anti-KL antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (#SAB2104815 and #SAB2105026) and Thermofisher (PA5-21078). Antibodies for detection of P-IGF1Rβ (Tyr1131) (#3021), p-AKT (Ser473) (#4060), AKT (#4685), p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (#9101), ERK1/2 (#9101), BiP (#3177), p-eIF2α (Ser51) (#3597), XBP-1s (#12782), c-PARP (Asp214) (#9541) and calreticulin (#12238) were obtained from Cell Signaling Technology. Antibodies for IGF-1Rβ (#sc-713), eIF2α (#sc-11386) and CHOP (#sc-793) were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-actin (#A2066) was from Sigma-Aldrich. After washing, blots were incubated for 1h with a horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibody (Sigma) and processed for chemiluminescent substrate (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions. Signal was detected using Fusion Fx7 (Thermo Fisher Scientific) imaging system. Actin was used as a loading control and quantification of protein abundance was performed by blot densitometry using the ImageJ 1.48v software (Wayne Rasband National Institue of Health, USA).

Cell proliferation

2500 cells were plated into 24-well plates. Culture medium was changed at days 0-3-5 with a final volume of 0.5mL per well. After trypsinization, cell number was evaluated by flow cytometry (FACS Calibur, Molecular Devices), based on their morphological features (FSC/SSC). Data acquisition and analysis were performed with PlateManager and CellQuestPro softwares. Data were summarized as mean (SD).

4) Clonogenic assay

100, 500 and 1000 cells were plated onto 6-well plates. Fresh culture medium was added every 2 to 3 days. After 10 days, cells were washed with PBS 1X, fixed with 70% ethanol, washed again and then stained with 1% Crystal Violet solution (Sigma-Aldrich). After several rinses with water and drying, plates were scanned.

5) MTT assay

5 000 cells were seeded into 96-well plates with complete culture medium. The day after, culture medium was replaced by drug-containing medium (final volume 0.2mL per well). After 72h, 20µL of 5mg/mL MTT substrate (Sigma) solution in PBS 1X were added to each well and plates were incubated 2h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Then, medium was discarded and formazan was dissolved in DMSO. Absorbance of each well was calculated by substracting A_{570nm}-A_{630nm}, measured with the microplate reader FlexStation 3 (Molecular Devices). For each condition, viability was calculated as a percent of control. Data were summarized as mean (SD). Response curves were interpolated with Prism6 v6.01 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA) software as standard slopes.

6) Mitochondrial potential loss assay (Tetramethylrhodamine, methyl ester, TMRM)

5 000 cells were seeded into 96-well plates with complete culture medium. The day after, culture medium was replaced by drug-containing medium. After 72h incubation, cells were loaded with 200nM TMRM dye (Fluka) and 20µM verapamil (Sigma) directly added into medium and plates were incubated at 37°C, 5% CO_2 during 30min. Then, supernatants were collected, cells were trypsinized and resuspended in their respective supernatants. TMRM-staining was analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience). Data acquisition and analysis were performed with PlateManager and CellQuestPro softwares. Cell population was determined on a FSC/SSC dot plot. Then, the region corresponding to cells that lost their mitochondrial potential (TMRM-negative cells) was selected on a SSC/FL2 dot plot diagram. The number of TMRM-negative cells is shown as a percent of cell population analyzed. Histograms summarize data as mean (SD). Response curves were interpolated with Prism6 v6.01 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA) software as standard slopes.

AnnexinV / propidium iodide dual staining assay

To perform the assay, 50 000 cells were seeded into 12-well plates with complete culture medium. After 24 h, medium was replaced and drugs were added to fresh medium**.** After 72 h incubation, cell death was assessed by dual Annexin V-FITC / PI staining (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI for flow cytometry, Molecular Probes) according to manufacturer's recommendations. For each condition, 10 000 cells were analyzed by flow cytometry (BD FASCCalibur). Data were acquired using CellQuestPro software (BD FACS Systems, Sunnyvale, CA). Data analysis was performed with FlowJo v10.1 (FlowJo LLC, OR) software. Cell population was selected on a FSC/SSC dot plot. The percent of late apoptotic/necrotic cells was determined by gating out the Annexin V^+/PI^+ cell population on a FL1/FL2 dot plot diagram. Results were expressed as mean (SD).

Cytosolic calcium imaging

Single-cell cytosolic calcium imaging was performed, using Fluo2 LR-AM calcium dye. Coverslips were mounted in a recording chamber positioned on the stage of an inverted epifluorescence microscope (IX70, Olympus) equipped with an x40 UApo/340-1.15W objective. Cells were loaded with 2 µM Fluo2 LR-AM at room temperature in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) for 30 min. Fluo2LR-AM exhibits limited compartmentalization in intracellular stores and is leakage resistant. The cells were rinsed with HBSS and incubated in the absence of the Ca^{2+} probe for 15 min to complete de-esterification of the dye. In some experiments, cells were placed in a Ca^{2+}-free medium (HBSS in which $CaCl_2$ was omitted and 100 μM EGTA was added). This medium was added to the cells just before recording to avoid intracellular calcium stores leaking. Fluo2LR-AM was excited at 485+/-22nm and images were captured at 530+/-30 nm at constant 10 sec intervals, at 12-bit resolution, by a fast-scan camera (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrics). Regions of interest (ROI) were drawn on certain recorded cells to restrict data collection to specific regions. Imaging was controlled by Universal Imaging software, including Metafluor and Metamorph. Fluorescence intensity changes were normalized to the initial fluorescence value F_0 and expressed as F/F_0 (relative $[Ca^{2+}]_{cyt}$). One field was acquired from each coverslip and the data pooled from six independent coverslips on three different days. Data was processed using OriginPro 7.5 software (Origin Lab). Data were summarized as mean (SD).

7) Statistical analysis

Each experiment was repeated several times. For examining the statistical significance of the results, analyses were performed with Prism6 v6.01 (GraphPad software Inc, La Jolla, CA) software. Normal distribution of data sets was examined with a Shapiro-Wilk normality test. If data passed normality test, statistical significance between two conditions was assessed with an unpaired t-test, otherwise a Mann-Whitney test was used. Significant differences are represented as * if p-value $p<0.05$, ** if $p<0.01$ and *** if $p<0.001$.

FUNDING SUPPORT: This work was supported by INCa PLBIO, and Ligue Contre le Cancer (Comité des Pyrénées Atlantiques).

AUTHORS CONTRIBUTION

PV and VD conceived the project, designed the experiments, analyzed data, and wrote the paper. PV supervised the project. VD, OM NT, AM, TD, PV conducted the experiments, FC provided cell lines, SB-D and FVC designed experiments and analysed data. OM, FC, SB-D and FVC revised the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST: The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. Pathology (Phila). 2014 Feb;46(2):95–104.
2. Dalal KM, Kattan MW, Antonescu CR, Brennan MF, Singer S. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. Ann Surg. 2006 Sep;244(3):381–91.
3. Henricks WH, Chu YC, Goldblum JR, Weiss SW. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. Am J Surg Pathol. 1997 Mar;21(3):271–81.
4. Tirumani SH, Tirumani H, Jagannathan JP, Shinagare AB, Hornick JL, Ramaiya NH, et al. Metastasis in dedifferentiated liposarcoma: Predictors and outcome in 148 patients. Eur J Surg Oncol EJSO. 2015 Jul 1;41(7):899–904.
5. Jones RL, Fisher C, Al-Muderis O, Judson IR. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2005 Dec;41(18):2853–60.
6. van der Graaf WTA. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Lond. Engl. 2012;379:1879–1886.
7. Lin F, Shen Z, Xu X, Hu B-B, Meerani S, Tang L-N, et al. Evaluation of the Expression and Role of IGF Pathway Biomarkers in Human Sarcomas. Int J Immunopathol Pharmacol. 2013 Jan 1;26(1):169–77.
8. Liang J, Li B, Yuan L, Ye Z. Prognostic value of IGF-1R expression in bone and soft tissue sarcomas: a meta-analysis. OncoTargets Ther. 2015 Jul 29;8:1949–55.

9. Conti A, Espina V, Chiechi A, Magagnoli G, Novello C, Pazzaglia L, et al. Mapping protein signal pathway interaction in sarcoma bone metastasis: linkage between rank, metalloproteinases turnover and growth factor signaling pathways. Clin Exp Metastasis. 2014 Jan 1;31(1):15–24.
10. Tomita Y, Morooka T, Hoshida Y, Zhang B, Qiu Y, Nakamichi I, et al. Prognostic Significance of Activated AKT Expression in Soft-Tissue Sarcoma. Clin Cancer Res. 2006 May 15;12(10):3070–7.
11. Benassi MS, Pazzaglia L, Novello C, Quattrini I, Pollino S, Magagnoli G, et al. Tissue and serum IGFBP7 protein as biomarker in high-grade soft tissue sarcoma. Am J Cancer Res. 2015;5(11):3446–54.
12. Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, et al. Enhanced Levels of Insulin-like Growth Factor Messenger RNA in Human Colon Carcinomas and Liposarcomas. Cancer Res. 1986 Dec 1;46(12 Part 1):6169–73.
13. Peng T, Zhang P, Liu J, Nguyen T, Bolshakov S, Belousov R, et al. An experimental model for the study of well differentiated and dedifferentiated liposarcoma; deregulation of targetable tyrosine kinase receptors. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 2011 Mar;91(3):392–403.
14. Boucher J, Softic S, Ouaamari AE, Krumpoch MT, Kleinridders A, Kulkarni RN, et al. Differential Roles of Insulin and IGF-1 Receptors in Adipose Tissue Development and Function. Diabetes. 2016 Aug 1;65(8):2201–13.
15. Kasprzak A, Kwasniewski W, Adamek A, Gozdzicka-Jozefiak A. Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. Mutat Res Mutat Res. 2017 Apr;772:78–104.
16. Miller ML, Molinelli EJ, Nair JS, Sheikh T, Samy R, Jing X, et al. Drug synergy screen and network modeling in dedifferentiated liposarcoma identifies CDK4 and IGF1R as synergistic drug targets. Sci Signal. 2013 Sep 24;6(294):ra85.
17. Janssen JAMJL, Varewijck AJ. IGF-IR Targeted Therapy: Past, Present and Future. Front Endocrinol [Internet]. 2014 Dec 23;5. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4275034/
18. Pappo AS, Vassal G, Crowley JJ, Bolejack V, Hogendoorn PCW, Chugh R, et al. A phase 2 trial of R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), in patients with recurrent or refractory rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, synovial sarcoma, and other soft tissue sarcomas: results of a Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration study. Cancer. 2014 Aug 15;120(16):2448–56.
19. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997 Nov 6;390(6655):45–51.
20. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. Science. 2005 Sep 16;309(5742):1829–33.
21. Chen C-D, Tung TY, Liang J, Zeldich E, Tucker Zhou TB, Turk BE, et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. Biochemistry (Mosc). 2014 Sep 2;53(34):5579–87.
22. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jan 26;242(3):626–30.
23. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho. Semin Nephrol. 2013 Mar;33(2):118–29.
24. Fan J, Sun Z. The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cells Dayt Ohio. 2016 Jun;34(6):1615–25.

25. Xie B, Chen J, Liu B, Zhan J. Klotho Acts as a Tumor Suppressor in Cancers. Pathol Oncol Res. 2013 Oct 1;19(4):611–7.
26. Rubinek T, Wolf I. The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor. Vitam Horm. 2016;101:197–214.
27. Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, et al. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2011 Jul 1;17(13):4254–66.
28. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. J Biol Chem. 2011 Mar 11;286(10):8655–65.
29. Zhou X, Fang X, Jiang Y, Geng L, Li X, Li Y, et al. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 2017 Feb 2;10(1):37.
30. Behera R, Kaur A, Webster MR, Kim S, Ndoye A, Kugel CH, et al. Inhibition of Age-Related Therapy Resistance in Melanoma by Rosiglitazone-Mediated Induction of Klotho. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2017 Jun 15;23(12):3181–90.
31. Takasu N, Takasu M, Komiya I, Nagasawa Y, Asawa T, Shimizu Y, et al. Insulin-like growth factor I stimulates inositol phosphate accumulation, a rise in cytoplasmic free calcium, and proliferation in cultured porcine thyroid cells. J Biol Chem. 1989 Nov 5;264(31):18485–8.
32. Valdés JA, Flores S, Fuentes EN, Osorio-Fuentealba C, Jaimovich E, Molina A. IGF-1 induces IP3 -dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. J Cell Physiol. 2013 Jul;228(7):1452–63.
33. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. Oncogene. 2008 Nov 27;27(56):7094–105.
34. Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, et al. Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. Cancer Res. 2016 Dec 1;76(23):6851–63.
35. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. Cell Death Differ. 2008 Aug;15(8):1304–17.
36. Chien W, Ding L-W, Sun Q-Y, Torres-Fernandez LA, Tan SZ, Xiao J, et al. Selective inhibition of unfolded protein response induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Oncotarget. 2014 Jun 1;5(13):4881–94.
37. Wang L, Zhang Y, Wang W, Zhu Y, Chen Y, Tian B. Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). PloS One. 2017;12(8):e0184110.
38. Harper MT, Poole AW. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores. Blood. 2012 May 3;119(18):4337–8.
39. Sadighi Akha AA, Harper JM, Salmon AB, Schroeder BA, Tyra HM, Rutkowski DT, et al. Heightened Induction of Proapoptotic Signals in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Primary Fibroblasts from a Mouse Model of Longevity. J Biol Chem. 2011 Sep 2;286(35):30344–51.
40. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. J Cell Sci. 2004 Aug 15;117(Pt 18):4135–42.
41. Olauson H, Mencke R, Hillebrands J-L, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating αKlotho. Bone. 2017 Jul;100:19–35.

42. Dubois C, Vanden Abeele F, Prevarskaya N. Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis. FEBS J. 2013 Nov 1;280(21):5500–10.
43. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca2+ leakage from the ER. EMBO J. 2012 Aug 1;31(15):3282–96.
44. Banerjee S, Zhao Y, Sarkar PS, Rosenblatt KP, Tilton RG, Choudhary S. Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2013;31(4–5):659–72.
45. Murakami S. Stress resistance in long-lived mouse models. Exp Gerontol. 2006 Oct;41(10):1014–9.
46. Pfaffenbach KT, Pong M, Morgan TE, Wang H, Ott K, Zhou B, et al. GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. J Cell Physiol. 2012 Dec;227(12):3803–11.
47. Bieghs L, Lub S, Fostier K, Maes K, Van Valckenborgh E, Menu E, et al. The IGF-1 receptor inhibitor picropodophyllin potentiates the anti-myeloma activity of a BH3-mimetic. Oncotarget. 2014 Apr 30;5(22):11193–208.
48. Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 2014 Oct 1;1843(10):2150–63.
49. Lee J, Jeong D-J, Kim J, Lee S, Park J-H, Chang B, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. Mol Cancer. 2010 May 18;9:109.
50. Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelevich A, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2012 Jun;133(2):649–57.
51. Wang L, Wang L, Song R, Shen Y, Sun Y, Gu Y, et al. Targeting Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase 2 by Curcumin Induces ER Stress-Associated Apoptosis for Treating Human Liposarcoma. Mol Cancer Ther. 2011 Mar 1;10(3):461–71.
52. Hisaoka M, Matsuyama A, Nakamoto M. Aberrant calreticulin expression is involved in the dedifferentiation of dedifferentiated liposarcoma. Am J Pathol. 2012 May;180(5):2076–83.
53. Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines [Internet]. [cited 2016 Oct 11]. Available from: http://austinpublishinggroup.com/genetics-genomic-research/fulltext/ajggr-v2-id1014.php

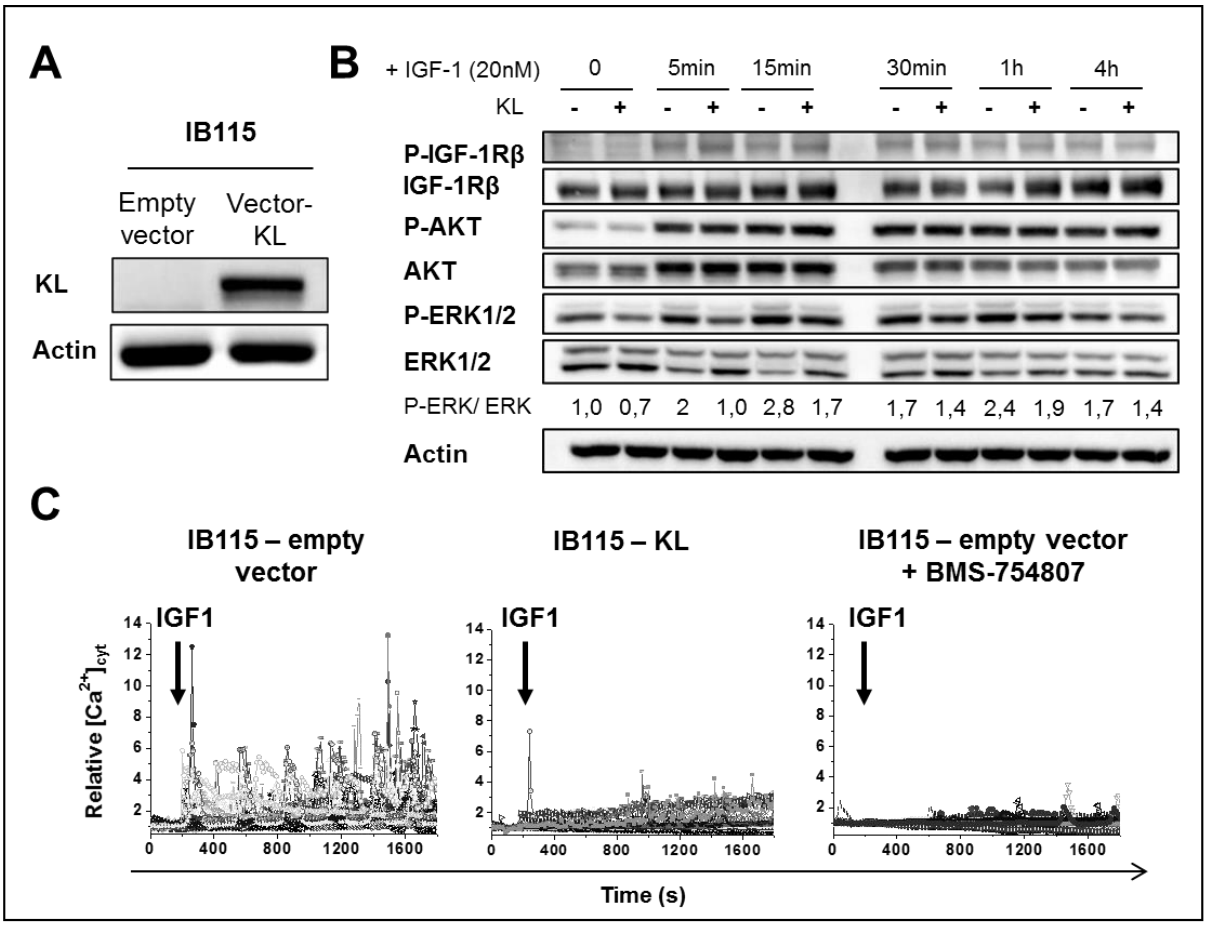


Figure 1 In the DDLPS cell line, Klotho reduces IGF-1R-dependent signaling

<u>Figure 1</u>: In the DDLPS cell line, Klotho reduces IGF-1R-dependent signaling

(A) Validation of *KL*-overexpression in IB115 cell line by Western blotting after lentiviral transduction. The 135kDa-band was not detected in control cell line expressing the empty vector. Actin was used as a loading control.

(B) Western blot analysis of IGF-1Rβ, AKT and ERK1/2 phosphorylation status during stimulation with 20nM IGF-1. For comparison of the ratios between phosphorylated form and total protein during treatment, results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, t0). Actin was used as loading control. Data shown are representative of three independent experiments.

(C) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored, by fluorescence video imaging in Fluo2-loaded cells bathed in HBSS (2mM Ca^{2+}) medium, and 20nM IGF-1 was added in the bath medium at 200s. Each trace corresponds to the evolution of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in one cell. Data shown are representative of three independent experiments.

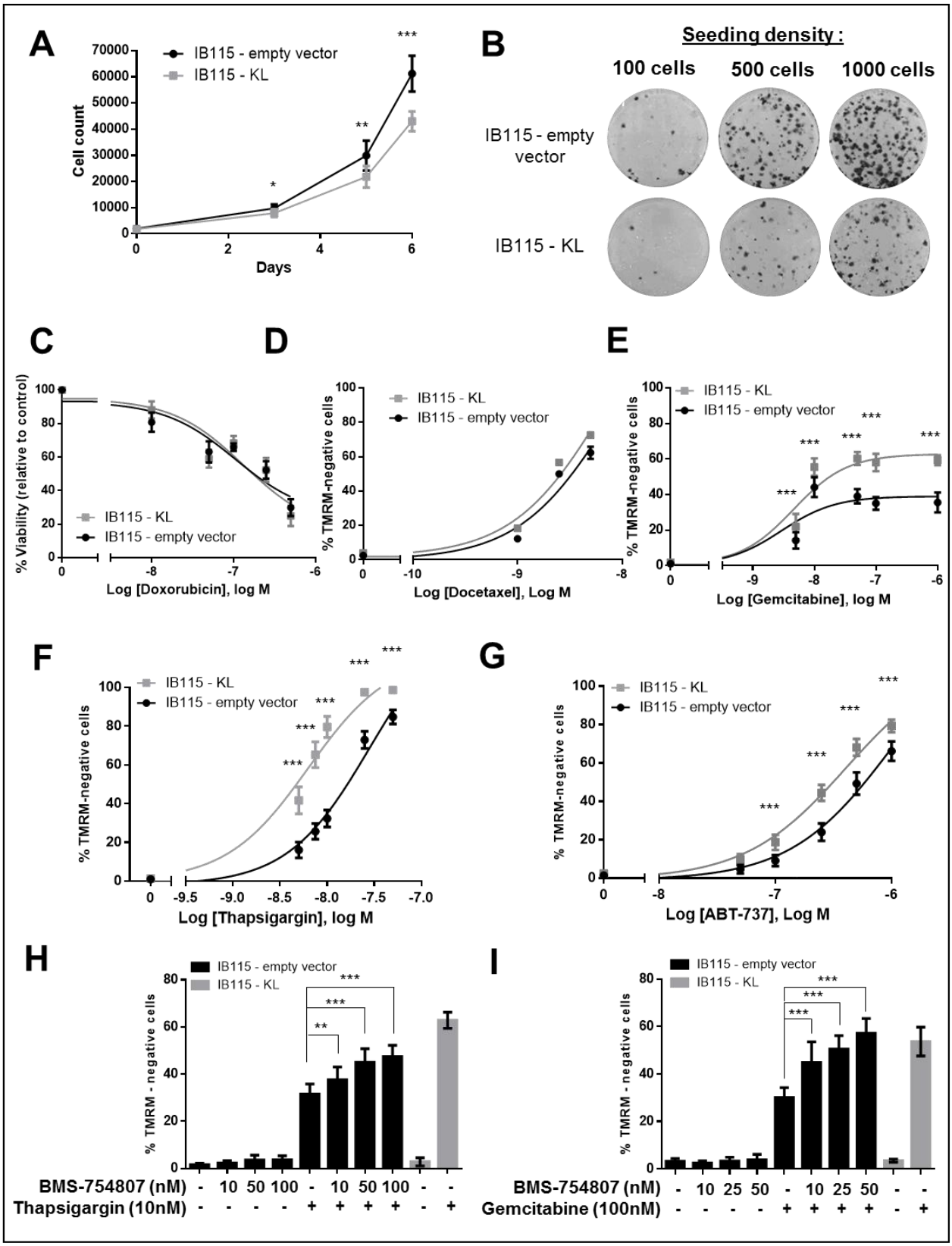


Figure 2 *KL* overexpression in a DDLPS cell line decreases its tumorigenic phenotypes.

Figure 2: ***KL*** **overexpression in a DDLPS cell line decreases its tumorigenic phenotypes.**

(A) Cell proliferation was assessed by flow cytometry as described in Material and Methods. *KL* significantly decreased cell number at days 3, 5 and 6 (*$p<0.05$, **$p<0.01$ and ***$p<0.001$, respectively). Results summarize three independent experiments.

(B) Clonogenicity was measured with crystal violet staining, in accordance with the protocol explained in Material and Methods. Data shown are representative of the results obtained in three independent experiments.

(C) Viability of IB115 cell lines after 72h incubation with several concentrations of doxorubicin was assessed by a MTT assay. Results are represented as a percent of control condition and summarize three independent experiments.

(D-G) Mitochondrial potential loss assay was evaluated by flow cytometry with TMRM-loaded cells after 72h incubation with **(D)** docetaxel, **(E)** gemcitabine, **(F)** thapsigargin (TG), and **(G)** ABT-737, according to the protocol described in Material and Methods. Compared to corresponding conditions with IB115-empty vector cells, *KL*-overexpression significantly ($p<0.001$) enhanced cell death induced by gemcitabine (maximal value of the curve reaches around 39% and 63% cell death, for IB115-empty vector and IB115-KL, respectively) thapsigargin (EC50 = 2.822e-8 *vs* 6.324e-9 for IB115-empty vector and IB115-KL cells, respectively) and ABT-737 (EC50 = 9.951.e-7 *v*s 4.073e-7 for IB115-empty vector and IB115-KL cells, respectively). Dose response curves were interpolated as standard slopes. Data shown summarize results obtained in at least three independent experiments.

(H-I) Cell death of IB115 cell lines was measured by TMRM-staining and flow cytometry. IB115 cell lines were pretreated 1h with indicated concentrations of BMS-7548074, and then treated for 72h with **(H)** 10nM thapsigargin (TG) or **(I)** 100nM gemcitabine. Compared to non-pretreated IB115-empty vector cells, BMS-7548074 significantly increased TG and gemcitabine-induced cell death in a dose-dependent manner. Histograms sum up **(H)** four and **(I)** three independent experiments.

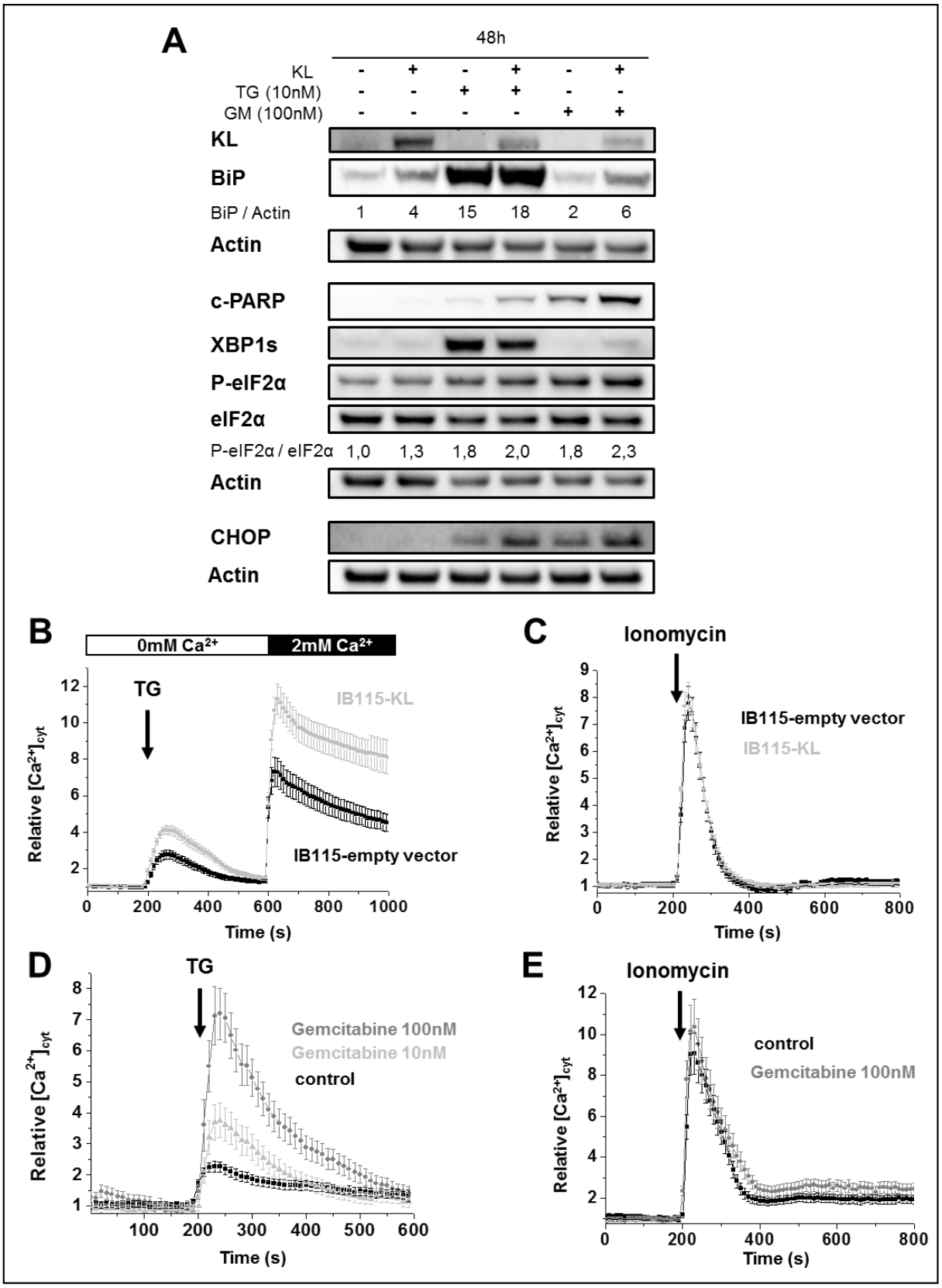


Figure 3 *KL*-overexpression sensitizes DDLPS to ER stress by disrupting intracellular Ca^{2+} homeostasis.

<u>Figure 3:</u> KL-overexpression sensitizes DDLPS to ER stress by disrupting intracellular Ca^{2+} homeostasis.

(A) Abundance and phosphorylation ratios of proteins implicated in ER stress were analyzed by western blotting after 48h incubation with no drug, 10nM thapsigargin (TG) or 100nM gemcitabine. Actin was used as a loading control. For comparison of the ratios between phosphorylated form and total protein during treatments, results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, no treatment). Results are representative of three independent experiments.

(B-E) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy in Fluo2-loaded cells bathed in Ca^{2+}-free HBSS medium. **(B, D)** TG (10nM) was added at 200s to evaluate intracellular Ca^{2+} mobilization and **(B)** at 800s, 2mM Ca^{2+} were applied to measure capacitive Ca^{2+} entry. **(C, E)** Ionomycin (100nM) was added at 200s to visualize ER Ca^{2+}-content.

(B-C) *KL* overexpression increased intracellular Ca^{2+} response to TG and the subsequent capacitive Ca^{2+} entry, but did not affect Ca^{2+} ER content, compared to IB115-empty vector cell line.

(D-E) IB115-empty vector cells were pretreated with gemcitabine during 48h at indicated concentrations. Gemcitabine increased **(D)** TG-induced Ca^{2+} response but **(E)** did not alter the size of reticular Ca^{2+} pools.

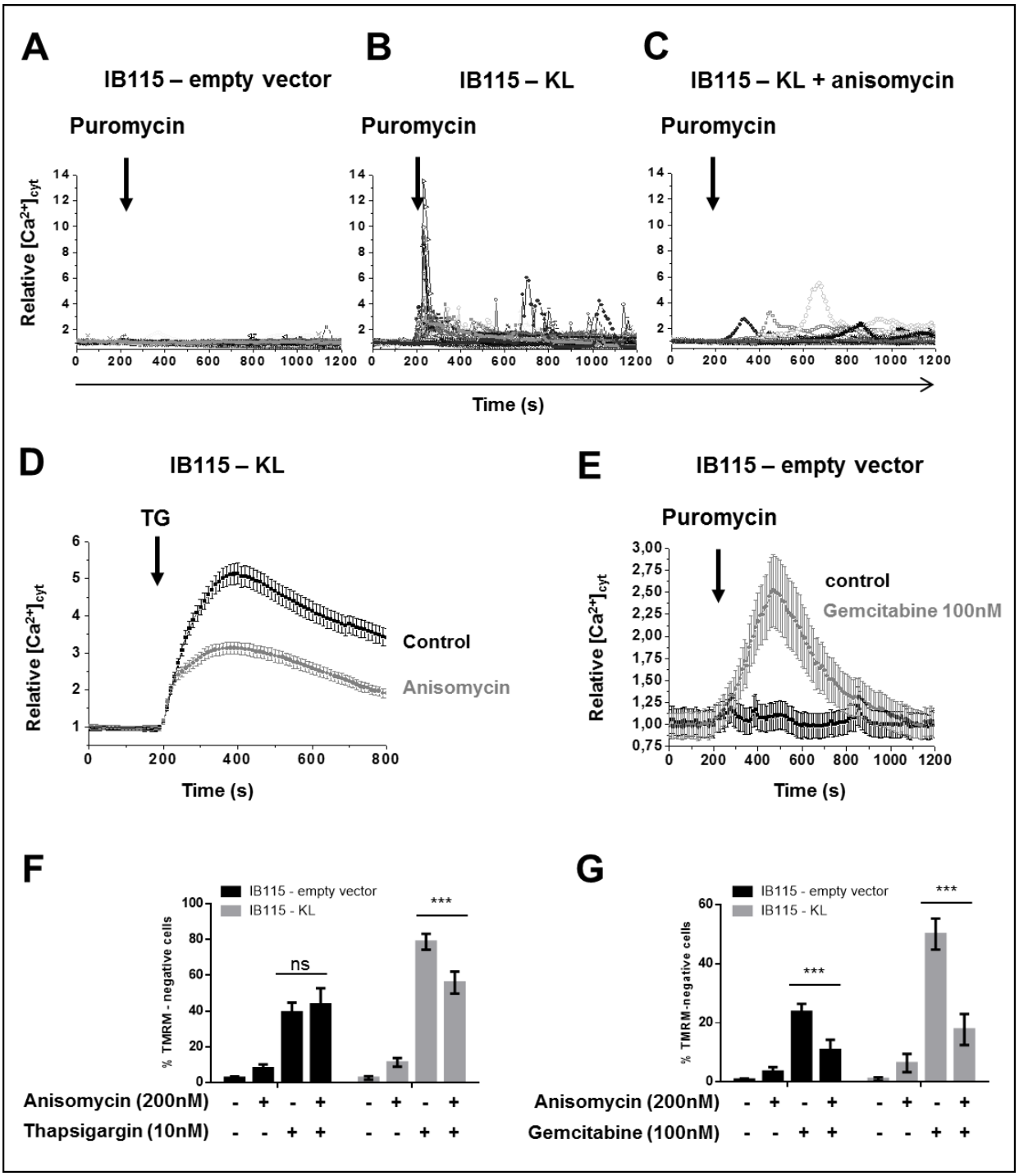


Figure 4 In DDLPS cells, Klotho promotes reticular Ca^{2+}-leakage and apoptosis by opening the translocon.

<u>Figure 4:</u> In DDLPS cells, Klotho promotes reticular Ca^{2+}-leakage and apoptosis by opening the translocon.

(A-E) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy, in Fluo2-loaded cells. Data shown are representative of three independent experiments.

(A-C) In a Ca^{2+}-free HBSS medium, puromycin (25µg/mL) was applied at 200s on **(A)** IB115-empty vector cells, **(B)** IB115-KL cells and on **(C)** IB115-KL cells pretreated 30min with 200nM anisomycin, a translocon-closing molecule. Each trace corresponds to the evolution of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in one cell.

(D) In a Ca^{2+}-free HBSS medium, IB115-KL cells, pretreated or not with 200nM anisomycin during 30min, were stimulated at 200s with TG (10nM) to evaluate reticular Ca^{2+} leakage.

(E) In a Ca^{2+}-free HBSS medium, IB115-empty vector cells, pretreated or not with 100nM gemcitabine during 24h, were stimulated at 200s with puromycin (25µg/mL) to assess Ca^{2+} leakage through the translocon.

(F-G) Cell death was measured by TMRM-staining and flow cytometry on IB115 cell lines pretreated for 1h with 200nM anisomycin and then incubated for 72h with **(H)** 10nM TG, or **(I)** 100nM gemcitabine. For each cell line, compared to non-pretreated cells, anisomycin significantly protected from gemcitabine-induced cell death. Concerning TG treatment, anisomycin reduced only apoptosis of IB115-KL cells. Histograms sum up **(H)** three and **(I)** four independent experiments.

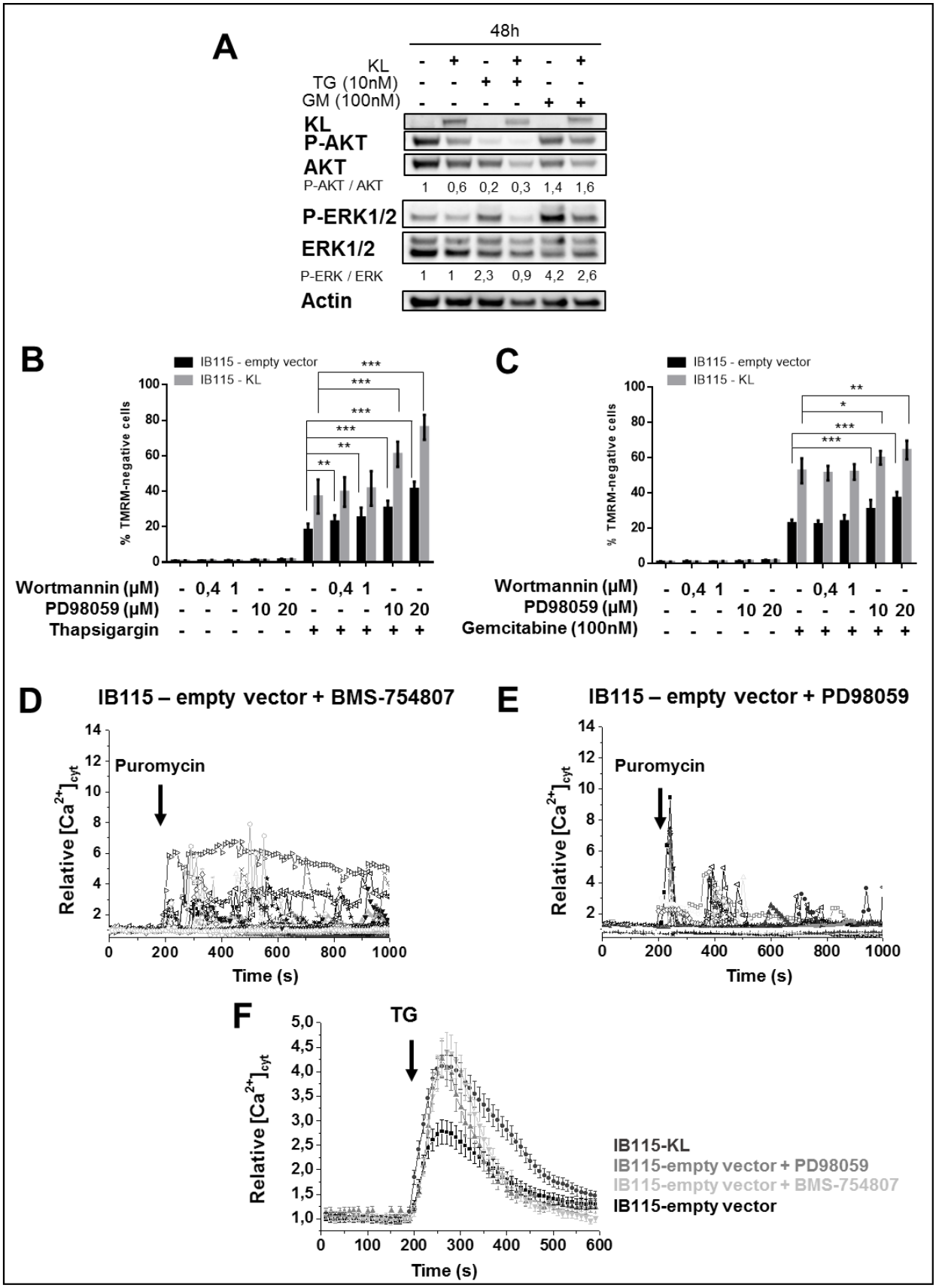


Figure 5 Klotho regulates drug sensitivity and reticular Ca^{2+}-leakage by inhibiting ERK1/2 signaling

<u>Figure 5:</u> Klotho regulates drug sensitivity and reticular Ca^{2+}-leakage by inhibiting ERK1/2 signaling

(A) Analysis by western blotting of the abundance of phosphorylated AKT and ERK1/2 compared to total protein expression, in IB115-empty vector and IB115-KL cells after 48h incubation with no drug, 10nM thapsigargin (TG) or 100nM gemcitabine. Actin was used as a loading control. For comparison of the ratios between phosphorylated form and total protein during treatments, results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, no treatment). Results are representative of three independent experiments.

(B-C) Cell death was measured by TMRM-staining and flow cytometry. IB115 cell lines were pretreated for 2h with Wortmannin or PD98059 as indicated and then incubated for 72h with **(B)** 20nM or 10nM TG for IB115-empty vector and IB115-KL cells, respectively, or **(C)** 100nM gemcitabine. Although moderately, Wortmannin significantly increased TG-induced cell death of IB115-empty vector cells. However, it did not affect apoptotic response of IB115-KL cells and gemcitabine-induced cell death in both cell lines. In contrast, PD98059 significantly potentiated cell death in a dose-dependent manner, after both TG or gemcitabine treatments. Histograms sum up **(B)** four and **(C)** three independent experiments.

(D-F) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored by fluorescence videomicroscopy, in Fluo2-loaded cells bathed in Ca^{2+}-free HBSS medium.

(D-E) Puromycin (25µg/mL) was added at 200s to IB115-empty vector cells pretreated with **(D)** BMS-754807 (50nM, 24h) or **(E)** PD98059 (1µM, 2h). Each trace corresponds to the evolution of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in one cell. Data shown are representative of three independent experiments. In both cases, puromycin induced important cytosolic oscillations.

(F) TG (10nM) was added at 200s to IB115-KL cells and IB115-empty vector cells, which were pretreated or not with BMS-754807 (50nM, 24h) or PD98059 (1µM, 2h).

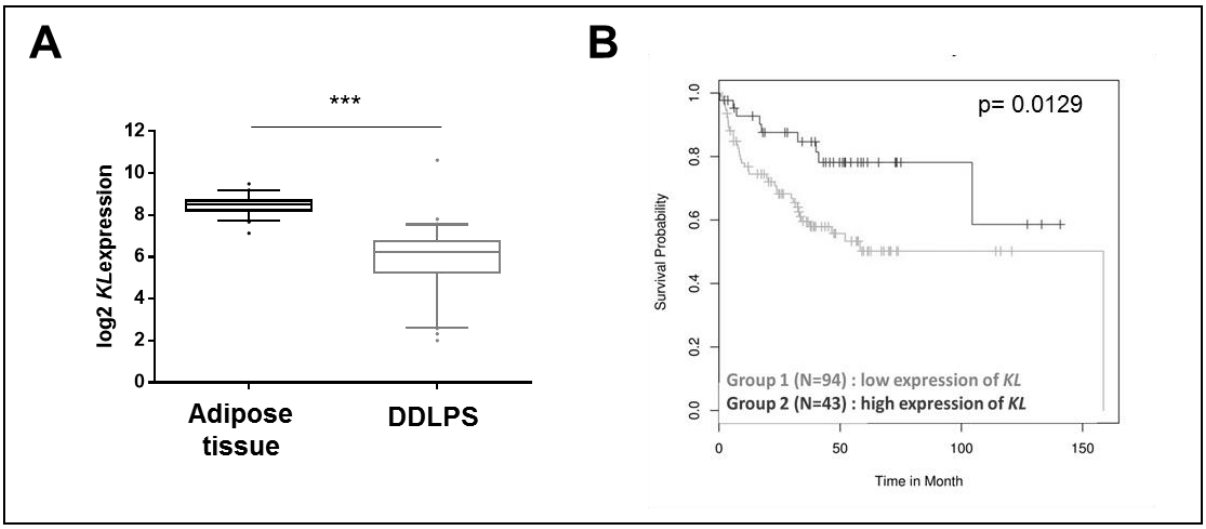


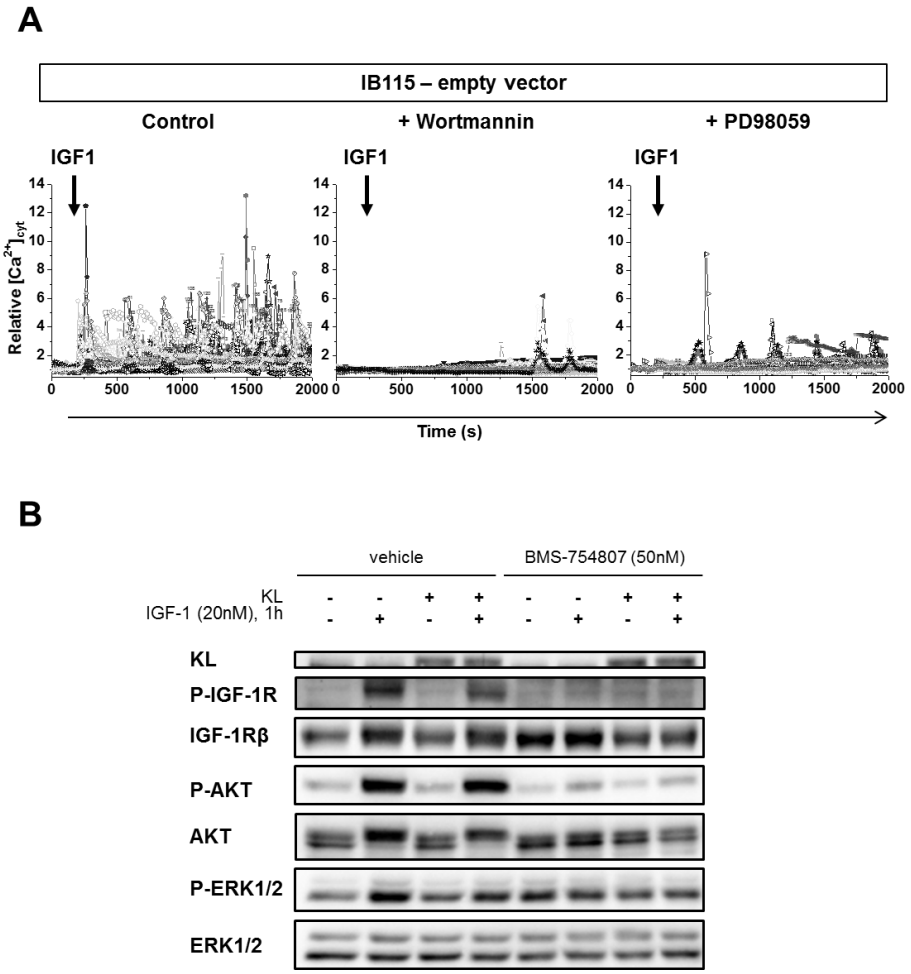
Figure 6 *KL* expression is altered in DDPLs tumors and has a prognostic value for liposarcoma patients

<u>Figure 6:</u> *KL* expression is altered in DDPLs tumors and has a prognostic value for liposarcoma patients

(A) Boxplot of *KL* mRNA expression in adipose tissue (n=49) and DDLPS tumors (n=61), profiled on gene expression microarray (GSE13506 and GSE21050, respectively) and normalized by GENT database. Line in the middle of the box is the median, whiskers are drawn down to the 5th percentile and up to the 95th. Points below and above the whiskers are represented as individual points. *KL* expression is significantly ($p<0.001$) reduced in DDLPS tumors compared to adipose tissue.

(B) Kaplan-Meier curves of overall survival in 137 liposarcoma patients divided into high- and low-risk groups according to their expression level of *KL* (high or low, cut-off = mean) determined by microarrays (data set ID: GSE30929). Kaplan Meier was generated by the Bioprofiling database. Higher *KL* expression is significantly associated ($p=0.0129$) with a better survival for LPS patients.

Supplemental Figure 1

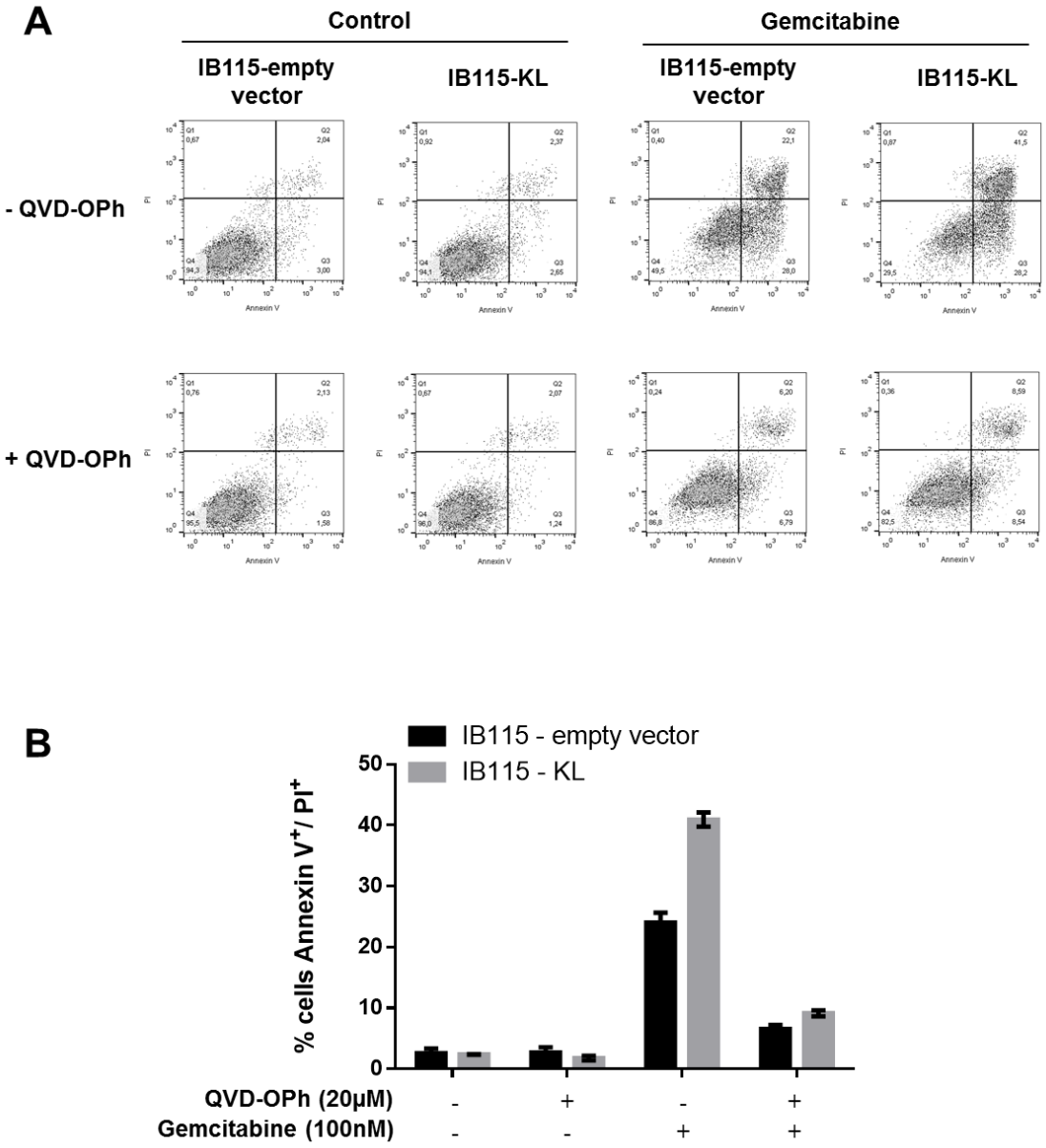


Supplemental figure 1:

(A) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored, by fluorescence video imaging in Fluo2-loaded IB115-empty vector cells bathed in HBSS (2mM Ca^{2+}), without any pretreatment (control), or pretreated with Wortmannin (1µM, 2h) or PD98059 (10µM, 2h). IGF-1 (20nM) was added in the bath medium at 200s. Each trace corresponds to the evolution of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in one cell. Data shown are representative of three independent experiments. PD98059 reduced the number of responding cells and the magnitude of responses, whereas almost no cytosolic response was observed in Wortmannin-pretreated cells.

(B) Western blot analysis of IGF-1Rβ, AKT and ERK1/2 phosphorylation status after 24h incubation of IB115-empty vector and IB115 KL cells in FBS-free medium with vehicle (DMSO) or BMS-754807 (50nM), and then 1h stimulation with 20nM IGF-1. Actin was used as loading control. BMS-754807 pretreatment efficiently repressed phosphorylation of IGF-1R, AKT and ERK1/2 induced by IGF-1.

Supplemental Figure 2



Supplemental figure 2

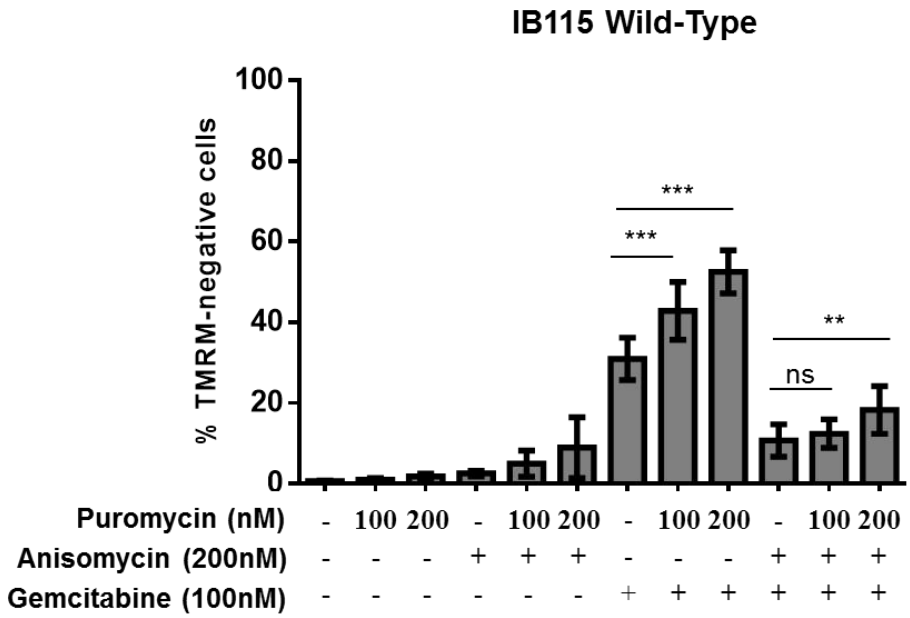
IB115 cell lines were pretreated or not 1h with the caspase inhibitor QVD-OPh (20µM) and then incubated 72h with gemcitabine at 100nM. Cell death was assessed by dual AnnexinV/PI staining analyzed by flow cytometry.

(A) Representative quadrants obtained for each condition.

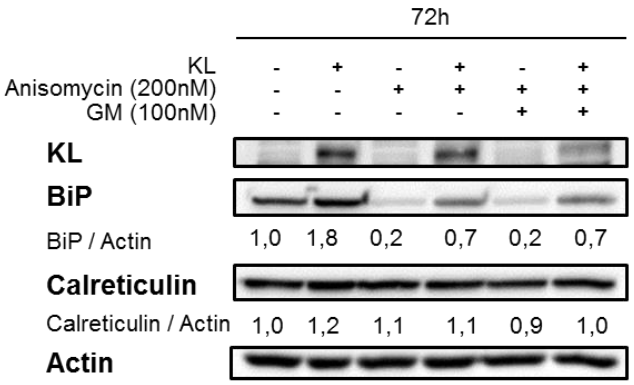
(B) Histograms summarize results that are representative of three independent experiments. Data are represented as mean +/- SD.

Supplemental Figure 3

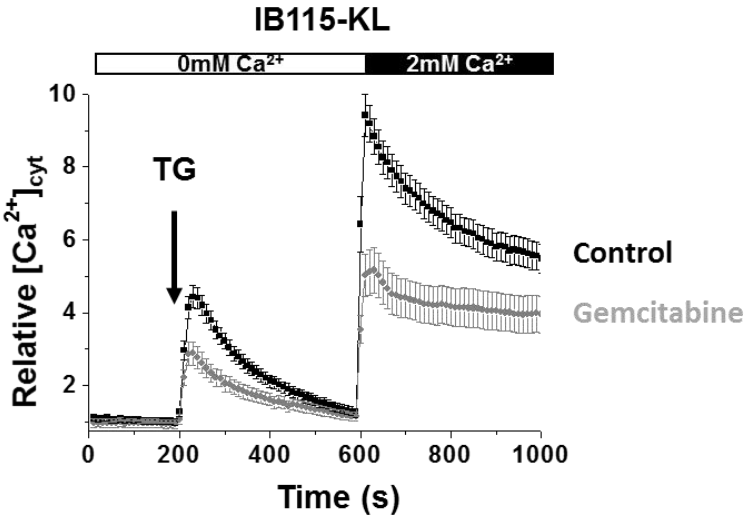
A



B



C



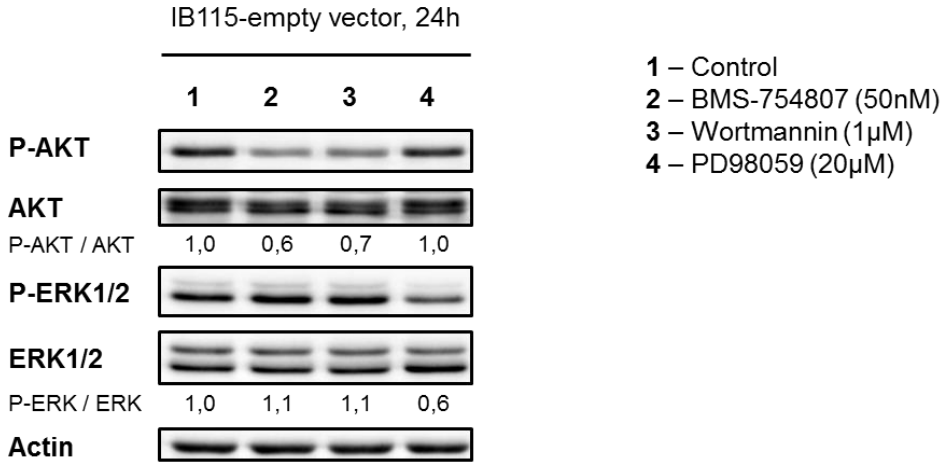
Supplemental figure 3

(A) Since the vector, expressed by transduced cells, contains the puromycin-resistance gene, IB115 parental cell line (wild-type) were pretreated or not 1h with anisomycin, then 1h with puromycin and finally incubated 72h with 100nM gemcitabine in combination with anisomycin, puromycin or both. Cell death was measured by TMRM-staining, analyzed by flow cytometry.

(B) Western blot analysis of KL, BiP and calreticulin abundance after 1h anisomycin (200nM) pretreatment and then 72h incubation of IB115-empty vector and IB115 KL cells with 100nM gemcitabine. Actin was used as loading control. To compare BiP and calreticulin abundance between conditions, results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, no treatment).

(C) Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored, by fluorescence video imaging in Fluo2-loaded cells bathed in Ca^{2+}-free HBSS medium, without any pretreatment (control), or pretreated with gemcitabine (100nM, 48h). TG (10nM) was added in the bath medium at 200s to study reticular Ca2+-leakage and 2mM Ca^{2+} were applied at 800s evaluate capacitive Ca^{2+} entry. Data shown are representative of three independent experiments. In IB115-KL cells, the TG-releasable Ca^{2+} pool is reduced after 48h treatment with gemcitabine.

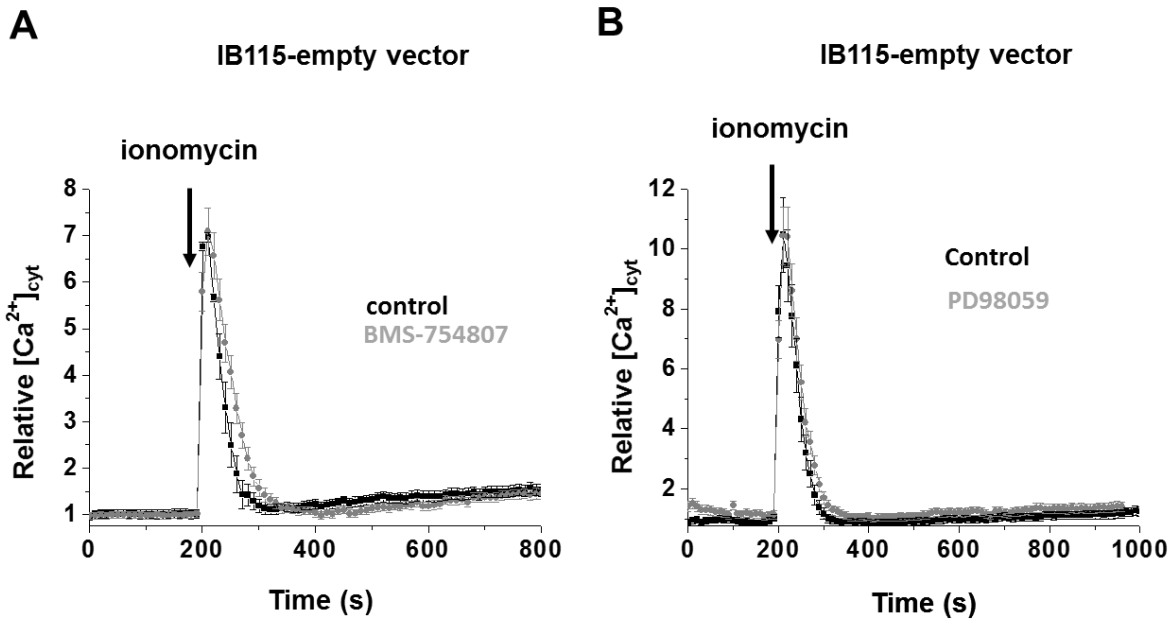
Supplemental Figure 4



Supplemental figure 4

Western blot analysis of AKT and ERK1/2 phosphorylation status in IB115-empty vector cells after 24h incubation with no drug, BMS-754807 (50nM), Wortmannin (1µM) or PD98059 (20µM). Actin was used as loading control. For comparison of the ratios between phosphorylated form and total protein during treatments, results were all normalized to control condition (IB115-empty vector, no treatment). AKT phosphorylation was reduced by BMS-754807 and Wortmannin treatments but was not affected by PD98059, which efficiently and specifically reduced ERK1/2 phosphorylation level. IGF-1R seem to be the major regulator of AKT in IB115 cells. Just like Klotho, BMS-754807 does not reduce basal ERK1/2 phosphorylation but prevents its hyperactivation by IGF-1 (see also Supplemental Figure 1B).

Supplemental Figure 5



Supplemental figure 5

Variations of relative cytosolic Ca^{2+} concentration were monitored, by fluorescence video imaging in Fluo2-loaded IB115-empty vector cells bathed in Ca^{2+}-free HBSS, without any pretreatment (control), or pretreated with **(A)** BMS-754807 (50nM, 24h) or **(B)** PD98059 (10µM, 2h). Ionomycin (100nM) was added in the bath medium at 200s. Data shown are representative of three independent experiments.

Résultats complémentaires

1) Contrôle de potentiels artefacts

Les résultats rassemblés montrent que la surexpression de *KL* augmente la proportion de translocons dans un état perméable au Ca^{2+}, ce qui augmente la fuite constitutive de Ca^{2+} et sensibilise à l'apoptose induite par le stress calcique du RE.

- ***Influence de la sélection à la puromycine***

Dans les cellules IB115-KL, on constate une fuite importante de Ca^{2+} lors d'une application en aigu de puromycine. Or, c'est le gène de résistance à la puromycine qui est utilisé pour sélectionner les cellules exprimant le vecteur après l'infection lentivirale. Après la sélection, dans le but d'éviter de favoriser une sous-population particulière, la puromycine a donc été retirée du milieu de culture.

En outre, afin de vérifier que la sélection initiale avec la puromycine n'induisait pas de biais dans les phénotypes observés, j'ai établi une deuxième série de lignées IB115-vecteur vide ou IB115-KL (« IB115 s2 »), soit sélectionnées à la puromycine, soit non sélectionnées, et j'ai comparé leur réponse à la mort induite par la TG et la gemcitabine avec celle des lignées de la première série d'infections lentivirales (« IB115 s1»).

Les résultats du marquage au TMRM analysé par cytométrie en flux après 72h de traitement avec la TG ou la gemcitabine sont présentés sur la **Figure 44**.

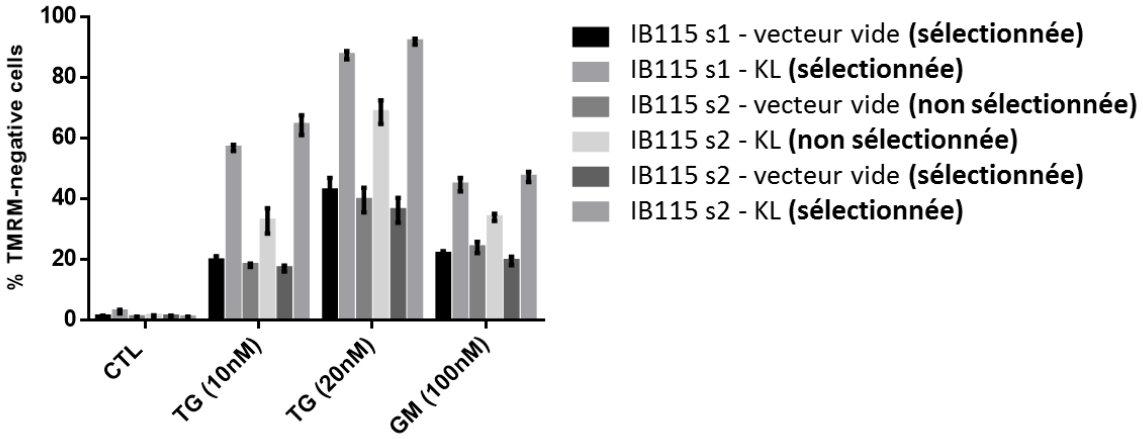


Figure 44 *Proportion de cellules apoptotiques dans les lignées établies avec ou sans sélection à la puromycine. Les histogrammes représentent les moyennes (SD) d'une expérience représentative.*

Dans toutes les lignées établies, avec ou sans sélection, on constate une sensibilisation à la mort induite par la TG et la gemcitabine lorsque *KL* est surexprimé. La potentialisation de la mort est similaire dans les lignées sélectionnées IB115 s1 et s2, ce qui démontre que les phénotypes observés ne sont pas dus à un artéfact causé par l'insertion aléatoire du vecteur dans le génome. D'autre part, la sélection à la puromycine n'introduit pas de biais puisque la lignée IB115 s2-KL non sélectionnée est également plus sensible à la TG et la gemcitabine.

Bien qu'on constate que la potentialisation de la mort est plus faible dans ces cellules, ceci s'explique par le fait qu'une plus faible proportion de la population cellulaire surexprime *KL*. En effet, le taux d'infection n'est pas de 100%, la sélection permet d'enrichir la population exprimant le vecteur en éliminant les autres.

Tous les résultats présentés ont été obtenus indifféremment sur les deux séries de lignée cellulaire établies.

- ***Effet de la surexpression d'une protéine sécrétée sur l'ouverture du translocon.***

Un autre artefact possible par rapport à la sensibilité au stress réticulaire pouvait provenir du fait de surexprimer une protéine membranaire devant suivre le circuit de sécrétion pour être adressée à la membrane plasmique. En effet, étant sous le contrôle d'un promoteur CMV, son expression n'est pas physiologique et pourrait perturber la protéostasie du RE ou influer sur l'ouverture du translocon.

Afin de vérifier que l'effet de Klotho sur le translocon et le stress du RE n'est pas un artefact dû au fait de surexprimer une protéine membranaire, j'ai établi dans les cellules IB115 par infection lentivirale la surexpression d'une protéine membranaire couplée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et n'étant pas un canal ionique. Son identité restera confidentielle car le vecteur utilisé est un cadeau cédé sous réserve de ne pas faire l'objet de publication.

L'effet de la surexpression de cette protéine membranaire (PM-GFP) a été étudié sur la réponse calcique à la TG, à la puromycine et sur la mort induite par la TG et la gemcitabine (**Figure 45**).

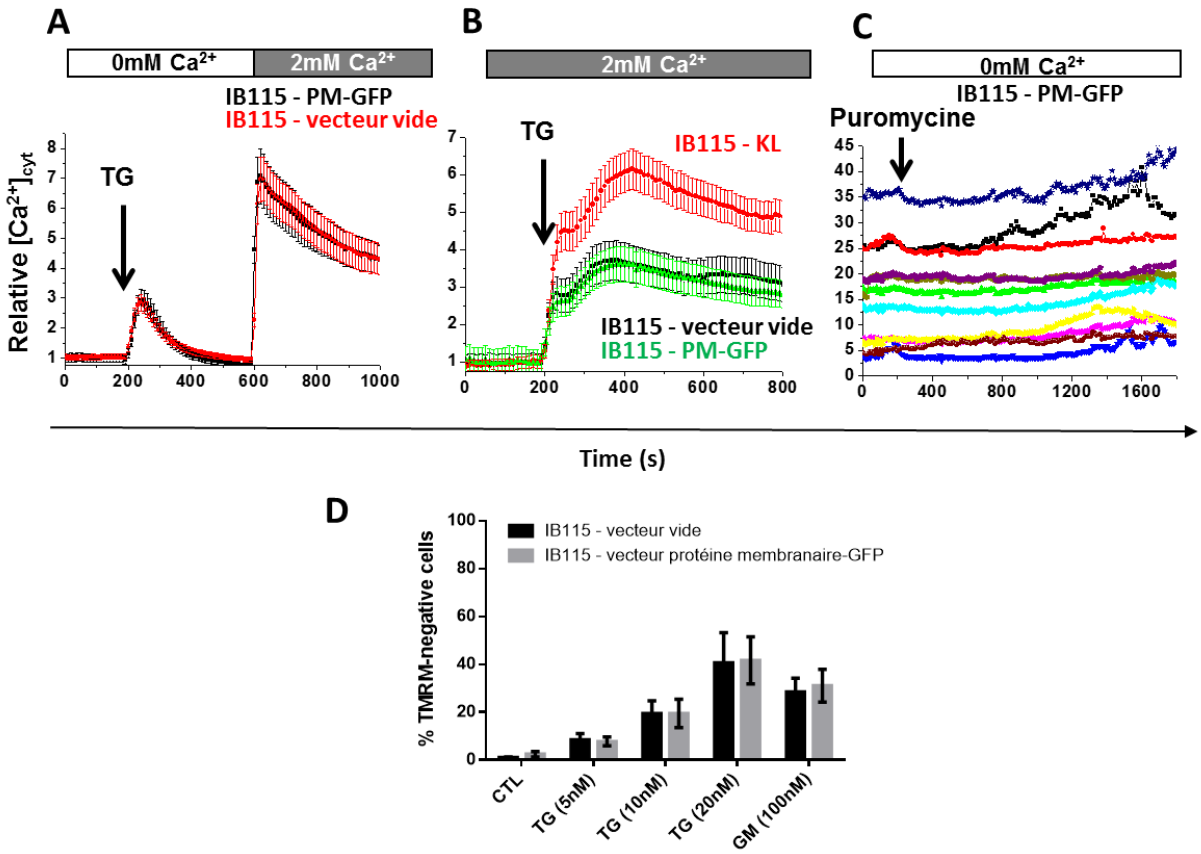


Figure 45 *Effet de la surexpression d'une protéine membranaire sur la réponse calcique à* ***(A-B)*** *la TG (10nM), à* ***(C)*** *la puromycine (25µg/mL) et sur* ***(D)*** *la réponse apoptotique à la TG ou la gemcitabine dans les cellules IB115.*

Entre la lignée contrôle et celle surexprimant la protéine membranaire, il n'y a pas de différence de mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire ni de l'entrée capacitive après application de la TG, contrairement aux cellules IB115-KL (**Figure 45 B**). De plus, après ajout de puromycine (**Figure 45 C**), il n'y a pas de variation de l'intensité de fluorescence du Fluo2 dans chacune des cellules, ce qui montre que la surexpression de la protéine membranaire n'affecte pas la fuite de Ca^{2+} par le translocon.

Enfin, la mort cellulaire induite par la TG ou la gemcitabine est similaire entre la lignée contrôle et celle surexprimant la protéine membranaire.

En conclusion, les effets observés dans les cellules surexprimant *KL* ne sont pas des artefacts dus à la sélection avec la puromycine, ni au fait de surexprimer une protéine membranaire suivant le processus de sécrétion, mais sont bien spécifiques de Klotho.

2) Autres canaux de fuite du RE modulés par Klotho

Il est décrit que le canal calcique TRPC6 peut subir une translocation au réticulum où il agit comme un canal de fuite sans pour autant modifier le contenu du RE en Ca^{2+} [298]. De plus, Klotho empêche l'exocytose de TRPC6 induite par IGF-1 en inhibant l'activité de la PI3K recrutée au niveau des radeaux lipidiques [168,175].

L'implication de TRPC6 dans la signalisation dépendante d'IGF-1 a d'ailleurs été confirmée dans les cellules IB115 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

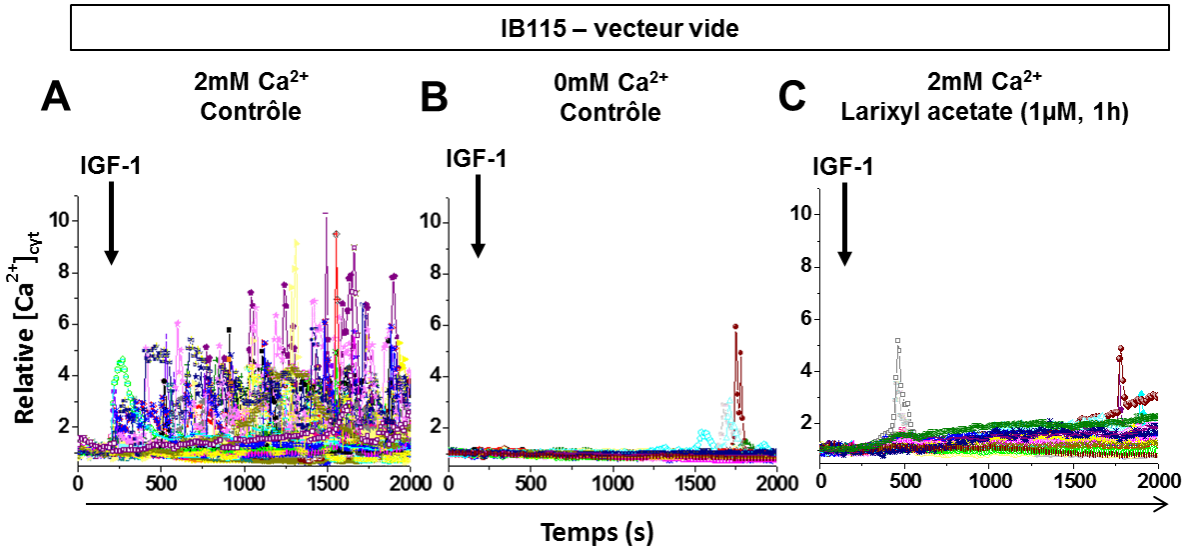


Figure 46 *L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 à la membrane plasmique est nécessaire à la réponse calcique induite par IGF-1 (20nM)*

En effet, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la réponse calcique cytosolique induite par IGF-1 est supprimée (**Figure 46A-B**). Une observation similaire est faite lorsque les cellules IB115-vecteur vide sont prétraitées avec l'inhibiteur spécifique de TRPC6, le larixyl acetate (**Figure 46C**). L'influx de Ca^{2+} par TRPC6 à la membrane plasmique est donc nécessaire à la génération des oscillations calciques induites par l'IGF-1.

J'ai donc testé l'hypothèse d'une éventuelle relocalisation de TRPC6 par Klotho dans les cellules IB115, qui pourrait alors contribuer à la fuite du Ca^{2+} réticulaire observée dans les cellules IB115-KL et expliquer l'absence de réponse calcique à l'IGF-1. Pour cela, l'OAG, un analogue structural du diacylglycérol (DAG), a été utilisé car il peut activer l'entrée de Ca^{2+} par les canaux TRPC3, 6 et 7 [385] (**Figure 47**).

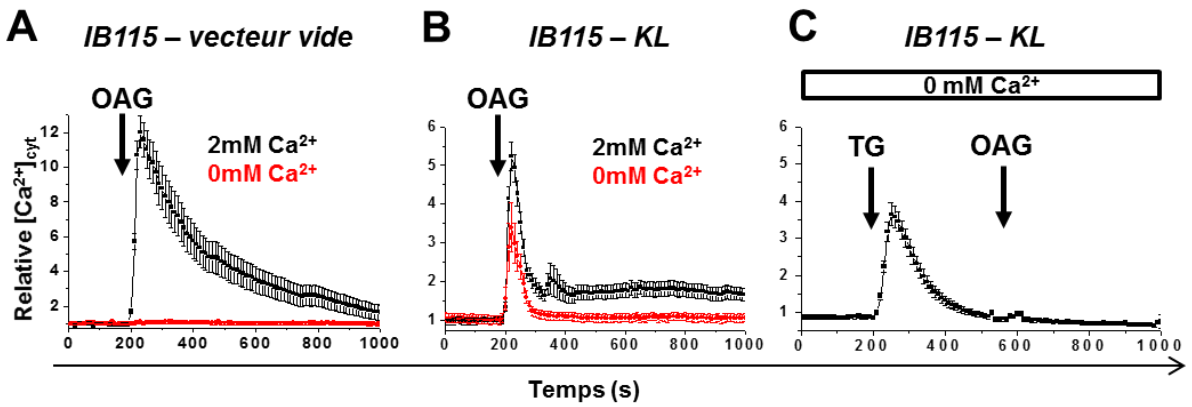


Figure 47 *La stimulation des cellules IB115 avec l'OAG (50µM) met en évidence une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire uniquement dans les celles surexprimant KL*

Lorsque l'OAG est appliqué dans le milieu d'enregistrement contenant 2mM Ca^{2+}, il induit une augmentation massive de la concentration relative du Ca^{2+} cytosolique dans les cellules de la lignée contrôle (**Figure 47A**). En revanche, en absence de Ca^{2+} extracellulaire, il n'y pas plus de réponse calcique, ce qui montre que la réponse à l'OAG dans les cellules IB115-vecteur vide provient uniquement de l'influx de Ca^{2+} à la membrane plasmique.

Dans les cellules surexprimant *KL*, la réponse à l'OAG est réduite (de moitié, en amplitude) par rapport aux IB115-vecteur vide en présence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire (**Figure 47B**). En absence de Ca^{2+}, le pic de réponse est en grande partie conservé, ce qui signifie que la réponse calcique cytosolique des cellules IB115-KL provient principalement de la mobilisation de stocks intracellulaires. L'application de TG (**Figure 47C**), qui entraîne une vidange du Ca^{2+} réticulaire, supprime la réponse à l'OAG de la lignée IB115-KL. En conclusion, dans la lignée contrôle les canaux TRPC activés par l'OAG sont localisés à la membrane plasmique tandis que dans la lignée surexprimant *KL*, ces canaux calciques sont principalement localisés au RE et impliqués dans la fuite de Ca^{2+} induite par la TG.

Afin de confirmer l'identité du(des) canal(aux) impliqué(s), les cellules IB115 ont été stimulées soit avec l'activateur spécifique de TRPC6, l'Hyp9, soit avec l'OAG ou la TG après un prétraitement avec des inhibiteurs de TRPC6 (U73343 et larixyl acetate) (**Figure 48**).

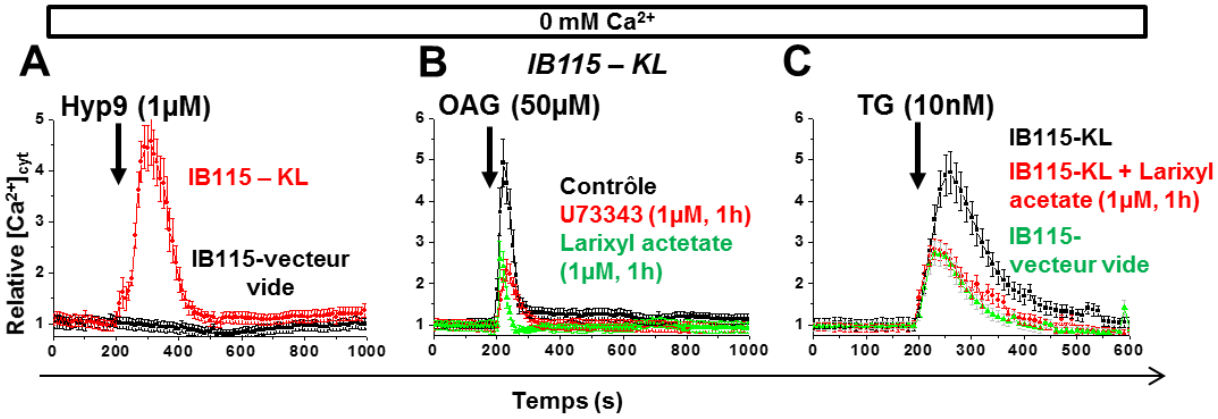


Figure 48 *L'implication de TRPC6 dans la réponse à l'OAG et la fuite du Ca^{2+} réticulaire des cellules IB115-KL est confirmée par l'utilisation de son activateur et son inhibiteur spécifiques dans un milieu sans Ca^{2+} extracellulaire.*

Dans un milieu d'enregistrement dépourvu en Ca^{2+}, seules les cellules surexprimant *KL* présentent une réponse calcique cytosolique à l'Hyp9 (**Figure 48A**), confirmant que TRPC6 peut mobiliser les réserves de Ca^{2+} intracellulaires dans ces cellules uniquement. De plus, le prétraitement des cellules IB115-KL avec des inhibiteurs de TRPC6 réduit de façon drastique la réponse à l'OAG (**Figure 48B**), suggérant que ce canal en est en grande partie responsable. Enfin, son inhibiteur spécifique (le larixyl acetate) réduit la réponse à la TG des cellules IB115-KL, qui devient similaire à celle de la lignée IB115-vecteur vide, ce qui confirme que ce canal est impliqué dans la fuite du Ca^{2+} réticulaire révélée par la TG (**Figure 48C**).

Etant donné que, malgré le larixyl acetate, une mobilisation calcique intracellulaire subsiste lors de la stimulation des cellules IB115-KL avec l'OAG, un autre canal semble impliqué. Le prétraitement des cellules IB115-KL avec l'inhibiteur spécifique de TRPC6 (larixyl acetate, 1µM pendant 1h) et celui de TRPC3 (Pyr3, 1µM pendant 1h) supprime l'augmentation de la concentration calcique cytosolique induite par l'OAG (50µM) (**Figure 49**).

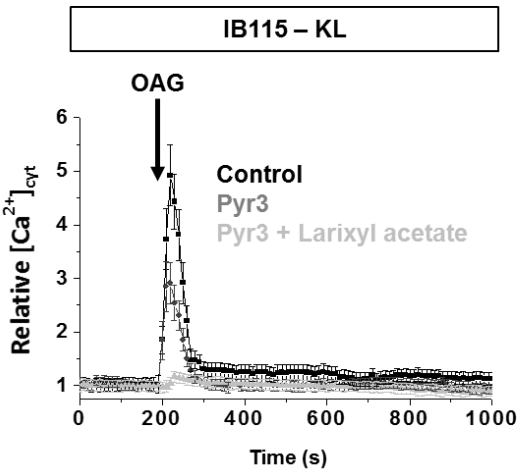


Figure 49 *Impact de l'inhibition de TRPC3 et TRPC6 sur la réponse à l'OAG dans les cellules IB115-KL en absence de Ca^{2+} extracellulaire.*

TRPC3 est donc le second canal TRPC participant à la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire en réponse à l'OAG dans les cellules IB115-KL. Toutefois, son implication est moins importante que celle de TRPC6 et aucun lien entre Klotho, IGF-1 et TRPC3 n'est décrit dans la littérature. De plus, l'inhibition de TRPC6 suffit à supprimer tout signal calcique dû à IGF-1 dans les cellules IB115 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Pour le reste de l'étude, je me suis donc focalisée sur la modulation de TRPC6 par Klotho.

Dans l'article, il est montré que Klotho agit sur le translocon en inhibant l'hyperactivation de la voie des MAPK induite par IGF-1R. L'effet de l'inhibition d'IGF-1R (avec le BMS-754807) et de MEK (avec le PD98059) sur la localisation de TRPC6 dans la lignée contrôle a donc été examiné (**Figure 50**).

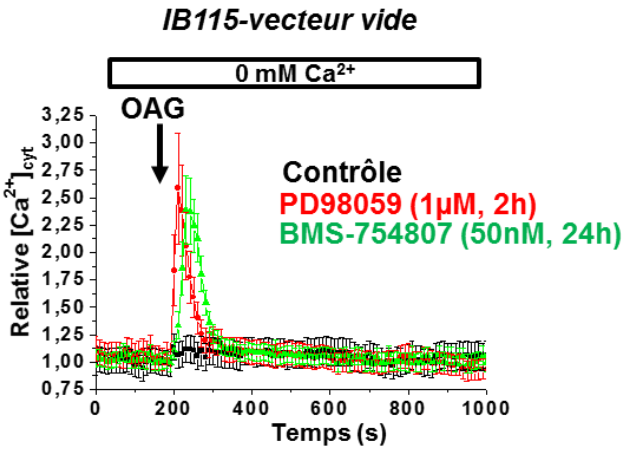


Figure 50 *Effet de l'inhibition d'IGF-1R ou de MEK sur la réponse à l'OAG (50µM) des cellules IB115-vecteur vide en absence de Ca^{2+} extracellulaire*

L'inhibition d'IGF-1R et de MEK dans la lignée cellulaire contrôle mime l'effet de Klotho sur la réponse à l'OAG, suggérant qu'il s'agit probablement du même mécanisme par lequel elle favorise l'ouverture du translocon et la séquestration de TRPC6 au RE (**Figure 50**). La relocalisation de TRPC6 au RE participe probablement à la sensibilisation à l'apoptose induite par le BMS-754807 et le PD98059.

L'ensemble des résultats indique que dans les cellules surexprimant *KL*, TRPC6 est relocalisé au RE et participe à la fuite du Ca^{2+} réticulaire, *via* l'inhibition de la voie des MAPK. La séquestration de TRPC6 pourrait donc participer à la sensibilisation des cellules IB115-KL au stress réticulaire induit par la TG ou la gemcitabine.

J'ai donc dans un premier temps étudié l'abondance de TRPC6 dans les lignées contrôle et surexprimant *KL* après 48h de traitement avec la TG ou la gemcitabine (**Figure 51**).

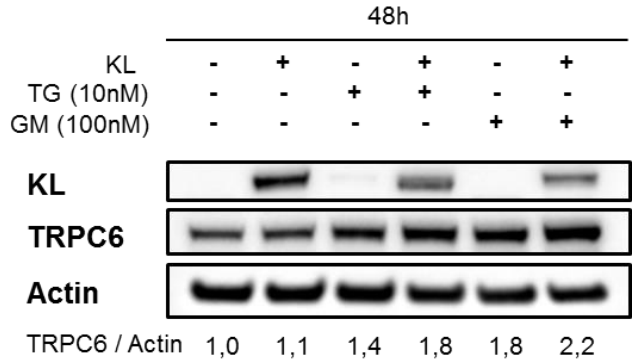


Figure 51 *Etude par western blot de l'impact de la TG et de la gemcitabine sur l'expression de TRPC6 après 48h de traitement.*

Il n'y a pas de différence significative de l'expression de TRPC6 entre les cellules IB115-vecteur vide et IB115-KL (**Figure 51**). En revanche, le traitement avec la TG ou la gemcitabine augmente son expression dans les deux lignées, mais de façon plus importante dans les cellules surexprimant *KL*. Ceci suggère que TRPC6 pourrait bien être impliqué dans l'apoptose induite par le stress du RE.

J'ai donc testé l'effet de son inhibition sur l'apoptose induite par la TG et la gemcitabine (**Figure 52**).

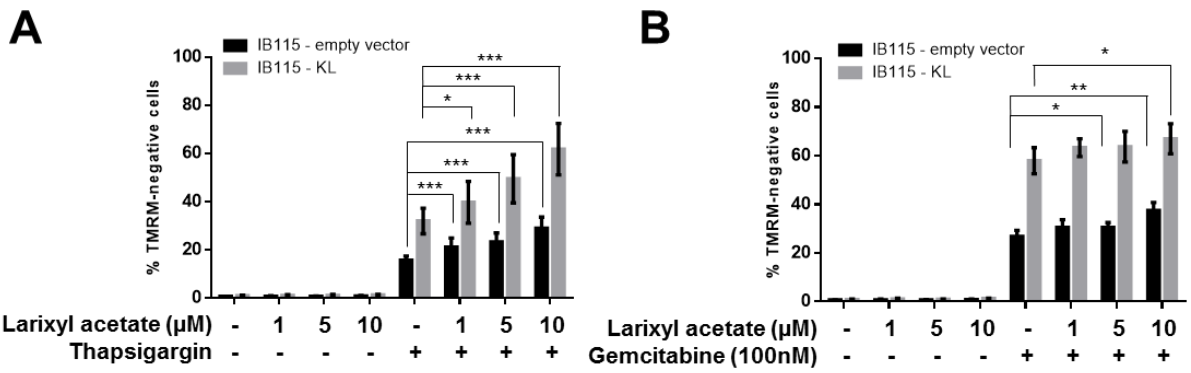


Figure 52 *Effet du larixyl acetate sur la mort cellulaire induite par la TG ou la gemcitabine.*

L'inhibition de TRPC6 augmente de façon significative la mort cellulaire induite par 72h d'incubation avec la TG dans les deux lignées cellulaires (**Figure 52A**). Etant donné que dans les cellules IB115-vecteur vide, TRPC6 n'est présent qu'à la membrane plasmique, ceci signifie que l'influx de Ca^{2+} par TRPC6 favorise la survie lors d'un stress réticulaire. Or le larixyl acetate inhibant à la fois les canaux TRPC6 à la membrane plasmique et au RE, il n'est pas possible de conclure quant au rôle de TRPC6 réticulaire dans les cellules IB115-KL.

Le larixyl acetate n'a pas d'effet notable sur la mort cellulaire induite par la gemcitabine, mis à part à 10µM dans les cellules IB115-vecteur vide. Aucun effet de protection n'est observé dans les cellules IB115-KL. TRPC6 ne semble donc pas être impliqué de façon majeure dans l'apoptose induite par la gemcitabine.

Bien que TRPC6 participe de façon non négligeable à la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire dans les cellules surexprimant *KL*, il ne semble pas avoir de rôle majeur dans la mort cellulaire induite par la TG ou la gemcitabine. Toutefois, son implication dans le stress du RE nécessiterait d'être vérifiée par d'autres méthodes, permettant de séparer ses effets au RE et à la membrane plasmique puisque son inhibition dans les cellules IB115-vecteur vide sensibilise au stress du RE.

En conclusion, le canal de fuite majeur impliqué dans la sensibilisation par Klotho au stress du RE est le translocon. TRPC6 doit probablement aggraver la fuite de Ca^{2+} mais sa contribution dans le stress du RE reste à déterminer.

L'ouverture du translocon et la localisation réticulaire de TRPC6 au RE semblent être régulées de façon similaire par Klotho, *via* l'inhibition de l'hyperactivation de ERK par IGF-1,

et participent toutes deux à la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire. L'existence d'un lien fonctionnel éventuel entre le translocon et TRPC6 a donc été étudiée.

Pour cela, les effets de l'inhibition du translocon sur la réponse à l'OAG et l'inhibition/activation de TRPC6 sur la réponse à la puromycine ont été testés en absence de Ca^{2+} extracellulaire sur des cellules IB115-KL. (**Figure 53**).

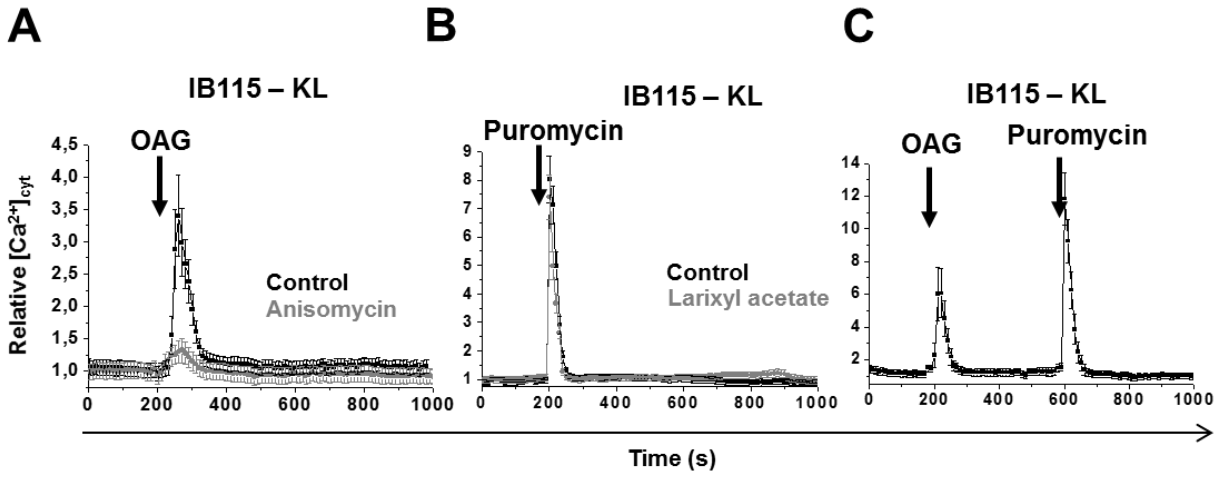


Figure 53 *Conséquences de la fermeture du translocon sur l'activité de TRPC6 et réciproquement, de l'activité de TRPC6 sur l'ouverture du translocon.*

L'anisomycine (200nM, 30min) réduit presque en totalité la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire induite par l'OAG (50µM), suggérant que le maintien du translocon dans une conformation imperméable au Ca^{2+} réprime l'ouverture de TRPC6 (**Figure 53A**). L'effet protecteur de l'anisomycine sur l'apoptose induite par la TG ou la gemcitabine n'est donc peut-être pas limité à l'inhibition de la fuite calcique par le translocon, mais également à celle de TRPC6. En revanche, l'inhibition de TRPC6 n'affecte pas la fuite de Ca^{2+} par le translocon (**Figure 53B**). De façon intéressante, la pré-stimulation des cellules surexprimant *KL* avec l'OAG (50µM) potentialise la libération de Ca^{2+} par le translocon suite à l'ajout de puromycine (25µg/mL) (**Figure 53C**).

Il semble donc qu'il y ait une coopération fonctionnelle entre le translocon et le canal TRPC6 au RE : la fermeture du translocon inhiberait TRPC6, mais la fuite de Ca^{2+} par ce dernier favoriserait le passage du translocon à un état conformationnel perméable au Ca^{2+}. Toutefois, ces observations doivent être confirmées et complétées par d'autres approches expérimentales. Enfin, le rôle des MAPK reste encore à être déterminé.

3) Devenir du Ca^{2+} réticulaire : évolution du Ca^{2+} mitochondrial

Le Ca^{2+} libéré dans le cytosol est en grande partie absorbé par les mitochondries, qui sont les tampons majeurs de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Etant donné que Klotho augmente la fuite du Ca^{2+} réticulaire, le contenu mitochondrial en Ca^{2+} a été évalué dans les lignées contrôle et surexprimant *KL*, en mesurant les variations relatives de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ après l'ajout de CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone), un protonophore qui agit comme un découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale et entraîne, avec la dissipation du potentiel mitochondrial, la fuite du Ca^{2+} mitochondrial (**Figure 54**).

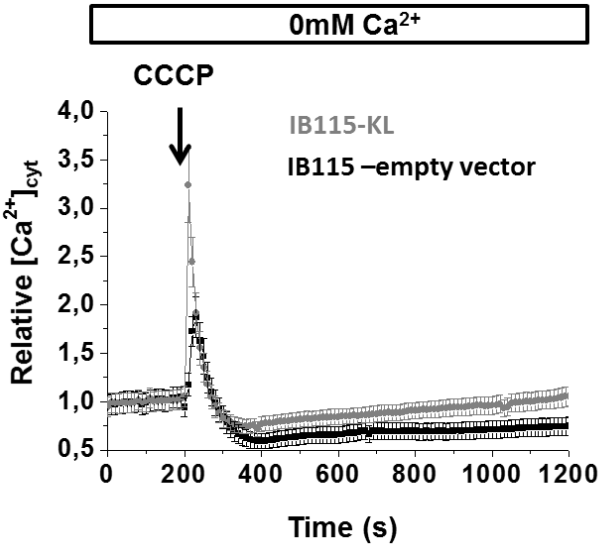


Figure 54 *Evolution de la $[Ca^{2+}]$ cytosolique relative après ajout de CCCP (1µM) en absence de Ca^{2+} extracellulaire*

Le pic de la réponse calcique au CCCP est de plus grande amplitude dans la lignée IB115-KL par rapport à la lignée contrôle, ce qui confirme qu'à l'état basal, il y a une plus forte accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries lorsque *KL* est surexprimé.

L'évolution de la concentration calcique relative mitochondriale a ensuite été suivie lors de l'ajout de 10nM de TG sur des cellules chargées avec la sonde calcique mitochondriale fluorescente Rhod2-AM (**Figure 55**).

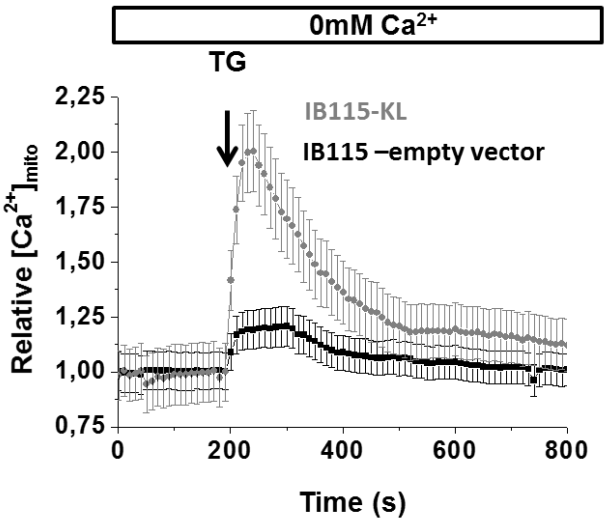


Figure 55 *Evolution de la [Ca^{2+}] mitochondriale relative après ajout de TG (10nM) en absence de Ca^{2+} extracellulaire*

Dans la lignée surexprimant *KL*, le pic d'augmentation de la [Ca^{2+}] mitochondriale est bien plus élevé que dans la lignée contrôle.

Il s'agit donc de la confirmation que la fuite du Ca^{2+} réticulaire stimulée par Klotho est compensée par son absorption dans les mitochondries. Lors du traitement avec la TG, l'accumulation de Ca^{2+} dans les cellules IB115-KL est bien supérieure à celle des cellules IB115-vecteur vide, augmentant le stress mitochondrial et favorisant l'apoptose.

4) Rôle antioxydant de Klotho sur la génération de ROS induite par la TG et la gemcitabine

La TG induit la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui accompagnent le stress réticulaire et participent à son effet apoptotique [386].

Cependant, les ROS jouent un rôle ambigu dans les cellules tumorales [387]. En effet, un taux de ROS modéré favorise la prolifération et la survie, tandis qu'une production trop élevée entraîne, en théorie, la mort cellulaire.

La gemcitabine également génère des ROS, qui sont supposées participer à son action cytotoxique. Toutefois, il est par exemple décrit que dans les cellules pancréatiques, les ROS dues à la gemcitabine activent, *via* ERK et AKT, les facteurs de transcription NFκB et HIF-1α qui favorisent la survie et la motilité [388].

Klotho étant décrite comme ayant un fort pouvoir antioxydant, ce qui explique en grande partie son rôle dans la longévité, son effet sur les ROS a donc été testé dans la lignée IB115,

tout d'abord sur la réponse à la TG. Pour cela, les cellules sont chargées avec la sonde H_2DCFDA qui émet de la fluorescence en présence de ROS, puis l'évolution de la fluorescence est enregistrée par vidéomicroscopie (**Figure 56**).

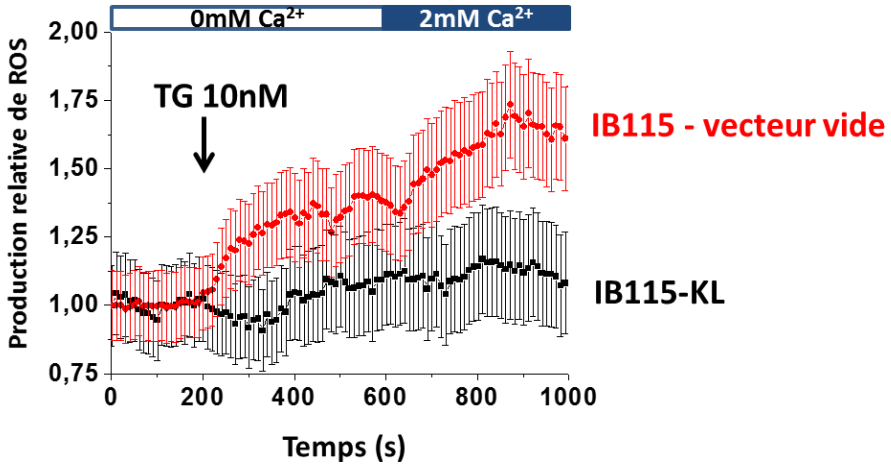


Figure 56 *Evolution relative des ROS intracellulaires lors de l'application de TG puis de l'ajout de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement*

Après l'application de TG en absence de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement, on observe une génération de ROS dans les cellules IB115-vecteur vide. La pente de la courbe est de nouveau augmentée dans la lignée contrôle lorsque le Ca^{2+} est ajouté dans le milieu, ce qui montre que la libération du Ca^{2+} réticulaire puis l'entrée capacitive entraînent la production de ROS. En revanche, lorsque *KL* est surexprimé, la pente de la courbe ne semble pas affectée de façon significative par les traitements. Il convient de noter que cet effet de la surexpression de *KL* sur la production de ROS n'est pas lié au calcium puisque dans les cellules IB115-KL, la réponse calcique à la TG est augmentée.

Afin de vérifier que ce sont bien les ROS qui sont responsables de l'augmentation de la fluorescence de l'H_2DCFDA après l'ajout de TG dans le milieu, deux inhibiteurs des ROS ont été utilisés (**Figure 57**).

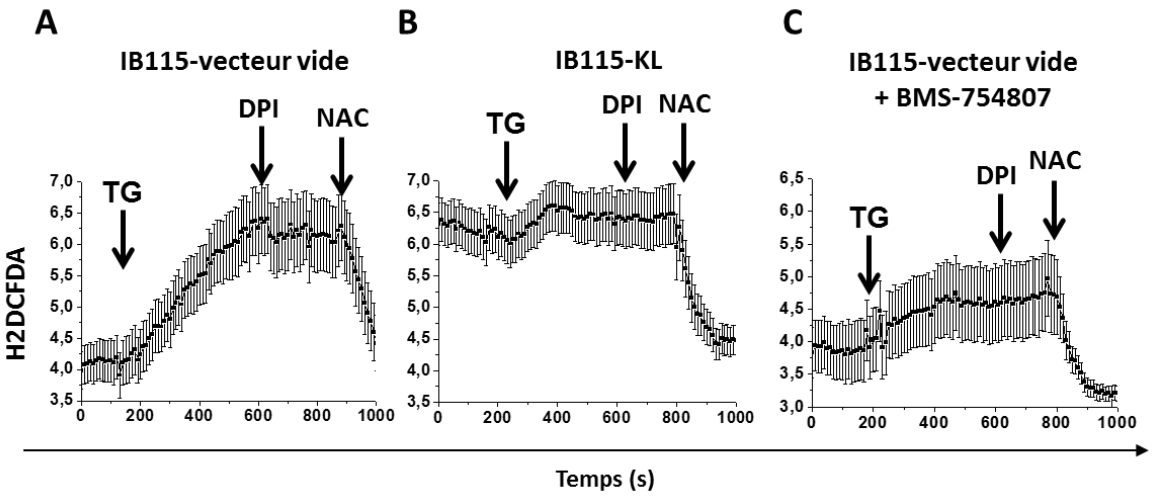


Figure 57 *Evolution des ROS dans les cellules après l'application de TG (10nM), puis d'inhibiteurs des ROS, le DPI (5µM) et le NAC (1mM)*

Le DPI (diphenyleneiodonium), inhibiteur des NADPH oxydases, est ajouté à 600s. Cet ajout stoppe l'augmentation des ROS intracellulaires induite par la TG. Le NAC (N-acetyl-L-cysteine) est une molécule antioxydante appliquée à 800s qui réduit les ROS. Dans les cellules IB115-vecteur vide, la pente de la courbe après l'ajout de TG est cassée par le DPI (**Figure 57A**), tandis que ce dernier ne modifie par celle des cellules IB115-KL, qui n'a pas été affectée par la TG de façon notable (**Figure 57B**).

Ceci confirme un rôle antioxydant de Klotho dans ces cellules. De plus, le prétraitement de la lignée contrôle avec 50nM de BMS-754807 pendant 24h mime les effets de Klotho : l'augmentation de la fluorescence est fortement réduite (**Figure 57C**).

Il semble donc que Klotho assure un rôle antioxydant dans les cellules IB115, au moins *via* l'atténuation de la voie de signalisation d'IGF-1R. Il serait donc intéressant de vérifier l'activité des facteurs de transcription de la famille FOXO dans les cellules IB115-KL et d'étudier le rôle des ROS dans la mort induite par la TG des cellules IB115.

Les résultats préliminaires concernant la gemcitabine semblent indiquer la même tendance (**Figure 58**).

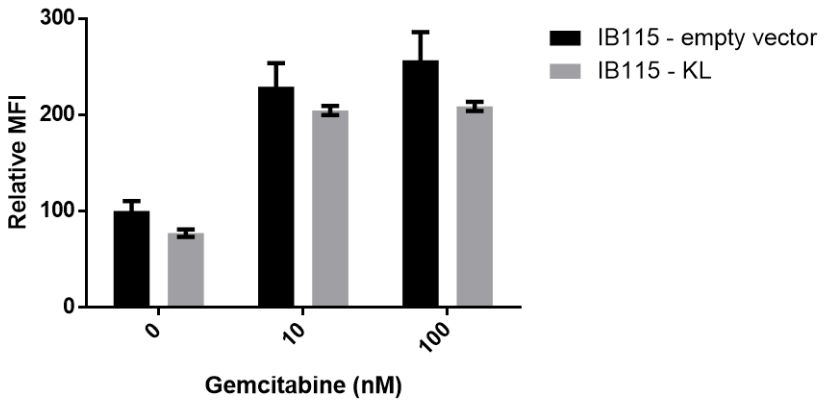


Figure 58 *Intensité moyenne de fluorescence (MFI) relative de la sonde H_2DCFDA analysée par cytométrie en flux après 56h d'incubation avec la gemcitabine*

Sur la **Figure 58**, on constate que la gemcitabine favorise bien la production de ROS et ce, dès 24h de traitement (résultats non montrés). De plus, l'intensité de fluorescence moyenne est réduite dans la lignée IB115-KL par rapport à la lignée contrôle. Des observations similaires ont été faites à 32 et 48h de traitement, mais tous ces résultats nécessitent d'être confirmés avec d'autres expérimentations faites à des temps identiques de traitement.

Il semble donc que la surexpression de *KL* inhibe l'élévation des ROS lors des traitements avec la TG et la gemcitabine. Ces données doivent être confirmées et les conséquences sur la réponse apoptotique doivent être examinées dans le futur.

L'action antioxydante de Klotho pourrait participer à l'atténuation de l'activation de ERK au cours des traitements. En effet, la génération de ROS active diverses MAPK [188]. Il sera donc intéressant de déterminer si c'est l'inhibition de ERK qui réduit les ROS ou la réciproque.

De plus, comme présenté dans le chapitre 2 de l'introduction, l'inhibition des ROS par Klotho empêche la sénescence. Or, lorsque les cellules sont traitées avec la gemcitabine, leur cycle cellulaire est altéré, comme le montre la **Figure 59**.

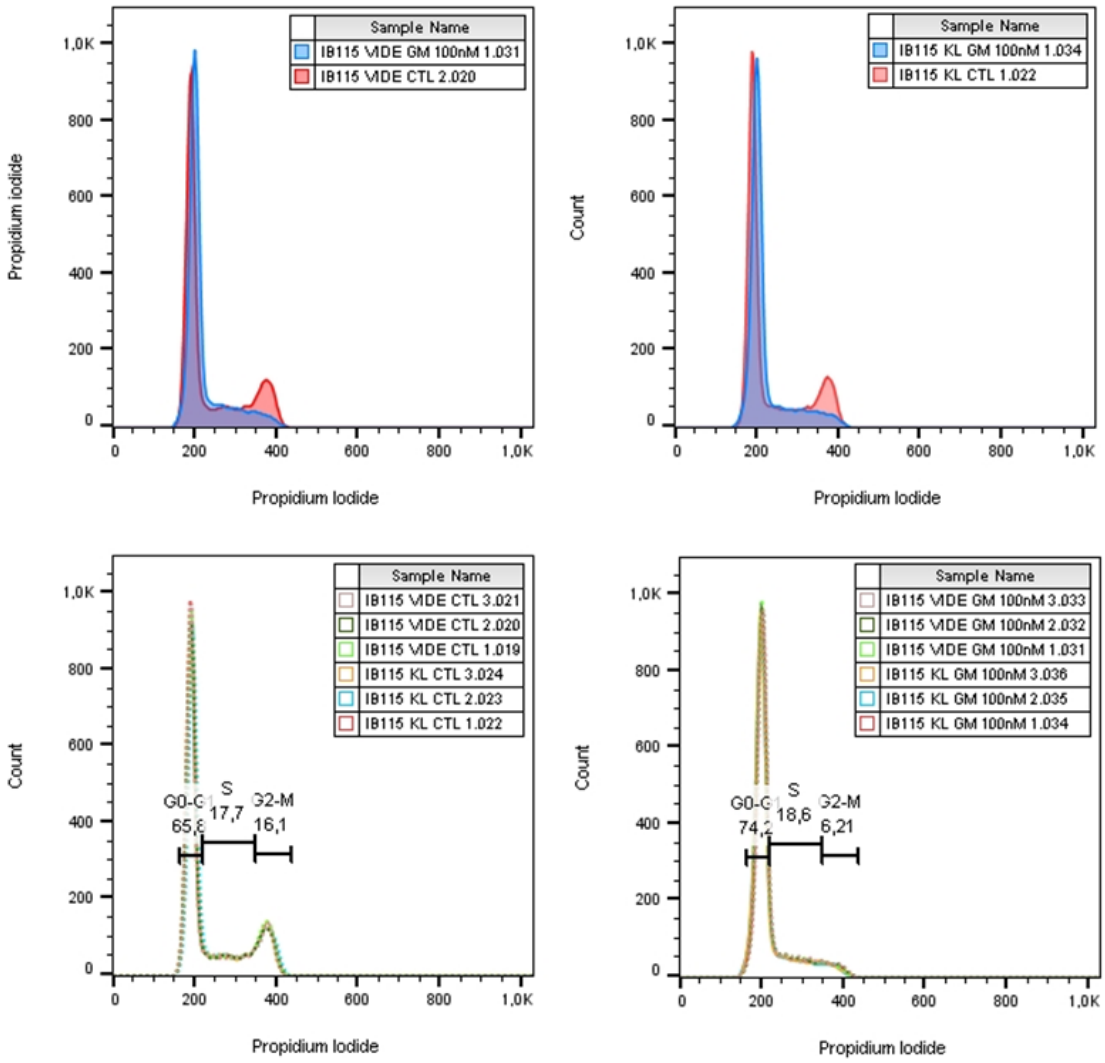


Figure 59 *Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et un marquage à l'iodure de propidium après 32h de traitement avec 100nM de gemcitabine*

Au cours du traitement avec la gemcitabine, le pic correspondant à la phase G2/M du cycle cellulaire est considérablement réduit. Ce profil de cycle cellulaire est conservé à des temps d'incubation plus importants (données non montrées). On constate un enrichissement dans la phase G0/G1, avec en moyenne 75% de cellules contre 65% environ dans les conditions contrôles. La superposition de la distribution des populations cellulaires en fonction de la quantité d'ADN montre qu'il n'y a pas de différence entre la lignée contrôle et la lignée surexprimant *KL*, avec ou sans traitement avec la gemcitabine.

En plus de l'arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire, les lignées cellulaires changent de morphologie, avec un corps cellulaire élargi, et deviennent dès 48h positives pour un marquage de l'activité β-galactosidase, suggérant une entrée en sénescence (**Figure 60**).

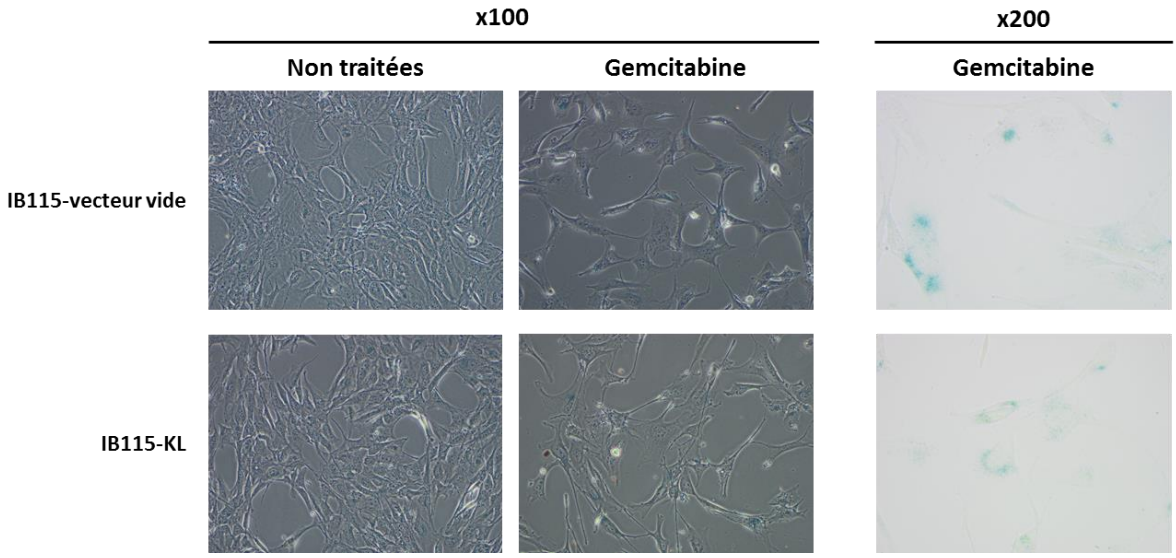


Figure 60 *Observation des lignées au grossissement x100 en contraste de phase et au grossissement x200 par coloration de l'activité β-galactosidase*

Les résultats préliminaires, qui devront donc être reproduits pour qu'une analyse statistique puisse être réalisée, montrent que la proportion de cellules positives pour le marquage de l'activité β-galactosidase est environ de 9% en conditions basales pour les deux lignées, mais qu'il est de 54% contre 34% dans les lignées IB115-vecteur vide et IB115-KL respectivement, après un traitement de 48h avec 100µM de gemcitabine.

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que Klotho réduit la génération de ROS ainsi que la sénescence induite par la gemcitabine. Or, la sénescence induite par les cytotoxiques dans la cellule cancéreuse n'est pas forcément suivie de l'apoptose et peut être réversible, notamment lorsque p53 est inactivée [389]. Ce phénomène contribuerait aux rechutes locales. De plus, les cellules sénescentes sécrètent dans le microenvironnement des facteurs et des cytokines qui favorisent la survie des cellules tumorales. C'est donc considéré, dans ce contexte, comme un mécanisme de résistance au traitement [373].

En inhibant les ROS et la sénescence, Klotho pourrait donc favoriser l'apoptose. Il s'agirait d'un autre mécanisme de sensibilisation à la chimiothérapie qu'il sera intéressant de confirmer.

5) Rôle de Klotho soluble (KLs) dans la sensibilité des cellules IB115 au stress réticulaire

Au cours des travaux précédents, seuls les effets de la forme membranaire de Klotho ont été étudiés. De nombreux travaux montrent que l'action de la forme soluble dans le milieu

extracellulaire suffit à restaurer ses fonctions de suppresseur de tumeur et à sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies.

A défaut d'anticorps très spécifique, je n'ai pas pu vérifier si la forme membranaire surexprimée dans les cellules pouvait être clivée par les protéases et générer des fragments solubles dans le milieu de culture. En revanche, j'ai pu utiliser des protéines recombinantes pour chacune des deux formes afin de tester leurs effets sur les DDLPS.

J'ai donc étudié l'effet des deux formes de KLs (ou sKlotho), celle à 130kDa contenant les domaines KL1 et KL2, et celle à 65kDa possédant uniquement le domaine KL1, sur la réponse à l'IGF-1, sur l'homéostasie calcique et sur la réponse apoptotique à la TG et à la gemcitabine. Pour toutes les mesures relatives de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, les formes solubles à 65kDa et 130kDa sont utilisées respectivement à 50ng/mL et 100ng/mL.

En premier lieu, l'effet des formes KLs sur la réponse calcique à l'IGF-1 a été testé (**Figure 61**).

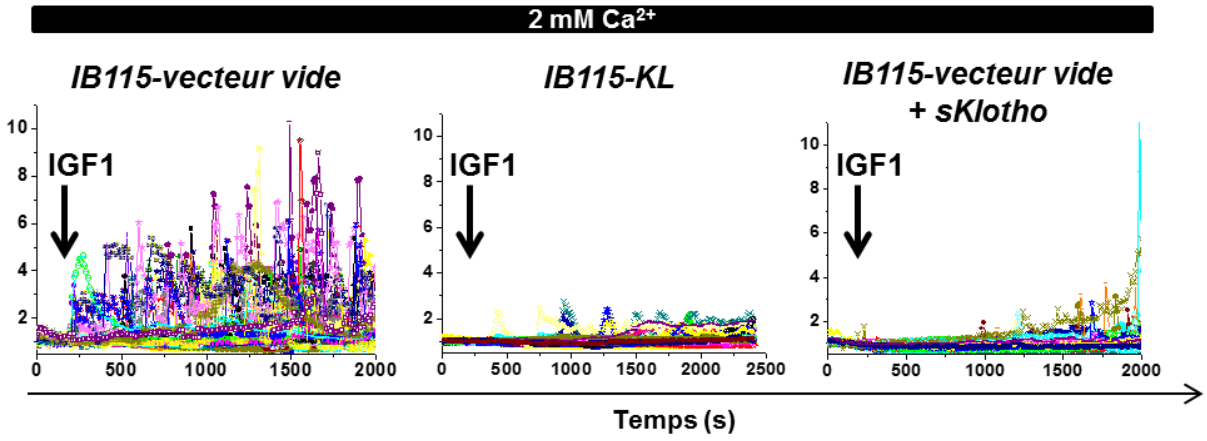


Figure 61 *Comparaison des effets des formes membranaire ou solubles sur la réponse calcique à 20nM d'IGF-1 en présence de 2mM de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement.*

Sur la **Figure 61**, chaque courbe de couleur représente la variation du ratio de fluorescence du Fluo2 dans une cellule différente. On constate que le prétraitement des cellules IB115-vecteur vide pendant 24h avec KLs supprime la réponse calcique induite par l'IGF-1, de façon semblable à la surexpression de la forme membranaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux formes de KLs.

Tout comme la surexpression de la forme membranaire de Klotho, le prétraitement pendant 24h avec les formes KLs réduit drastiquement la réponse calcique à l'IGF-1. J'ai donc

comparé par western l'activation d'IGF-1R, AKT et ERK1/2 après 1h de traitement avec 20nM d'IGF-1 entre des cellules IB115-vecteur vide et IB115-KL, contrôles ou prétraitées avec le BMS-754807 (50nM, 24h), et des cellules IB115-vecteur vide prétraitées avec la forme soluble KLs (130kDa) pendant 24h à 100ng/mL (**Figure 62**).

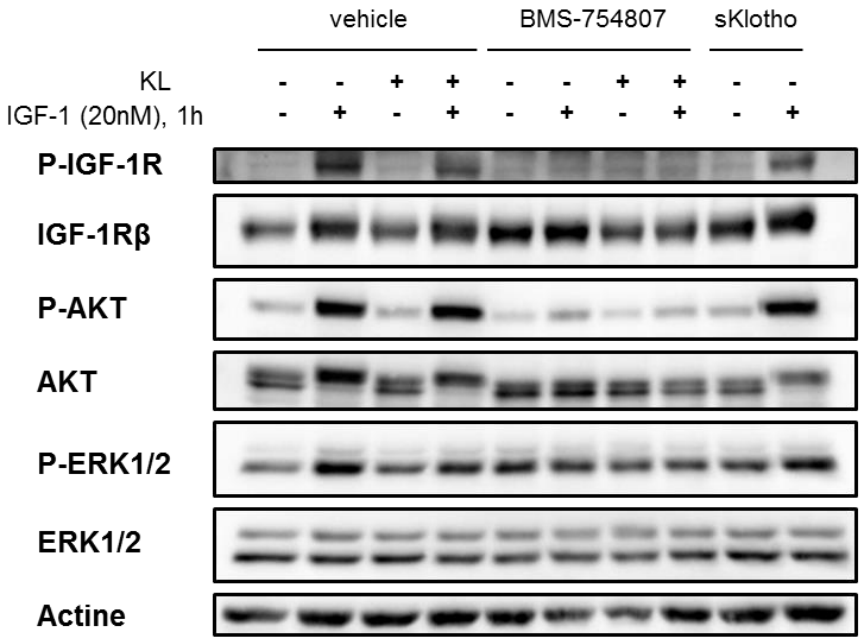


Figure 62 *Etude par western blot de l'activation par phosphorylation des acteurs de la voie de signalisation de la voie IGF-1R après 1h de stimulation avec IGF-1, dans des cellules contrôles, prétraitées avec le BMS-754807 (50nM, 24h) ou des cellules IB115-vecteur vide prétraitées 24h avec KLs (130kDa).*

On obtient bien une réduction de la phosphorylation de ERK1/2 lorsque le gène *KL* est surexprimé (**Figure 62**). Le BMS-754807 bloque efficacement l'activation par phosphorylation de l'ensemble de la voie. En revanche, le prétraitement avec KLs semble n'affecter aucun des acteurs. La phosphorylation réduite d'IGF-1R dans les cellules surexprimant *KL* et celles prétraitées avec KLs n'ayant pas été reproduite de façon systématique, je considère que les différentes formes de Klotho n'ont pas d'effet à ce niveau.

Bien qu'elles ne semblent pas avoir d'effet sur l'activation de ERK1/2, les formes KLs affectent la signalisation calcique des cellules IB115. Leur impact éventuel sur l'homéostasie calcique réticulaire a donc été étudié (**Figure 63**).

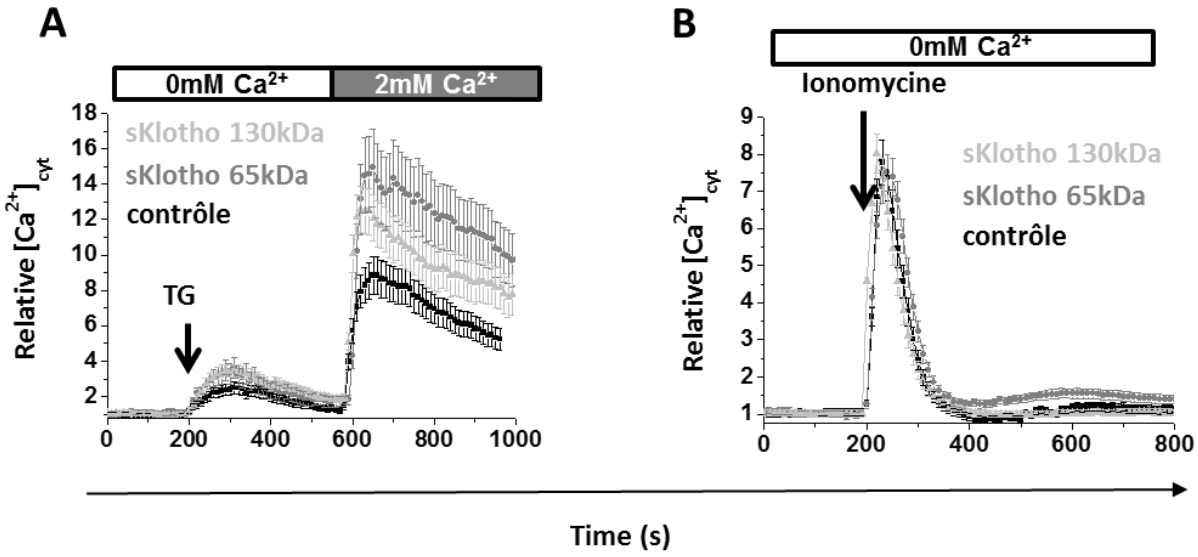


Figure 63 *Estimation du contenu réticulaire en Ca^{2+} dans les cellules IB115-vecteur vide, avec ou sans 24h de prétraitement avec KLs, avec application de (A) TG ou (B) ionomycine.*

Sur la **Figure 63A**, on peut constater qu'un traitement des cellules contrôles avec chacune des formes solubles de Klotho entraîne une augmentation de la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} après l'application de la TG en absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, ainsi que de l'entrée capacitive révélée par l'ajout de 2mM de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement. Cette différence de réponse à la TG n'est pas due à une différence de taille du contenu réticulaire en Ca^{2+}, comme le montre l'ajout d'ionomycine sur les cellules (**Figure 63B**), mais certainement à une fuite calcique réticulaire augmentée.

Les deux formes KLs semblant avoir des effets similaires à ceux de la forme membranaire sur le fuite du Ca^{2+} réticulaire, les réponses à l'OAG, à l'Hyp9 et à la puromycine ont été étudiées dans les cellules IB115-vecteur vide prétraitées 24h avec KLs (**Figure 64**).

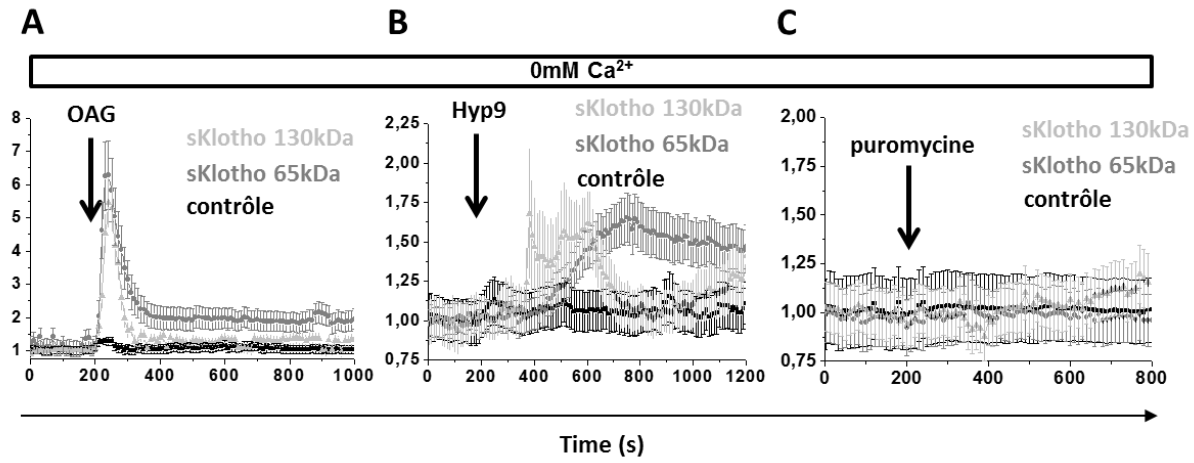


Figure 64 *Etude de la fuite passive du Ca^{2+} réticulaire par TRPC6 (A, B) et par le translocon (C) dans les cellules IB115-vecteur vide, avec ou sans prétraitement avec chacune des formes KLs*

En l'absence de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement, le prétraitement pendant 24h des cellules IB115-vecteur vide avec les formes solubles de Klotho restaure la réponse calcique à l'OAG observée dans les cellules surexprimant la forme membranaire de Klotho (**Figure 64A**). La stimulation avec l'Hyp9 confirme que TRPC6 est bien impliqué dans la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire après l'action des formes KLs (**Figure 64B**). Toutefois, on constate qu'en comparaison avec les réponses obtenues avec les cellules IB115-KL, ces augmentations de la concentration calcique cytosolique sont bien plus faibles et induisent chacune un profil de réponse différent. Il semble donc que KLs aussi relocalise TRPC6 dans la cellule. Mais TRPC6 ne semble pas être le seul canal concerné, étant donné que la réponse à l'OAG est conservée mais que celle à l'Hyp9 est réduite. De plus, l'activité du canal semble différer selon la forme utilisée pour la prétraitement (65 ou 130kDa).

Enfin, le prétraitement avec les KLs n'induit pas de réponse calcique à la puromycine, pourtant observée dans les cellules IB115-KL, ce qui tend à montrer que la relocalisation de TRPC6 par Klotho est un mécanisme indépendant de la régulation du translocon (**Figure 64C**).

L'impact des formes solubles de Klotho sur la réponse apoptotique au stress du RE a ensuite été abordé en incubant les cellules, prétraitées ou non 24h avec KLs dans un milieu de culture contenant 2% de SVF, avec 10nM de TG pendant 48h (**Figure 65**).

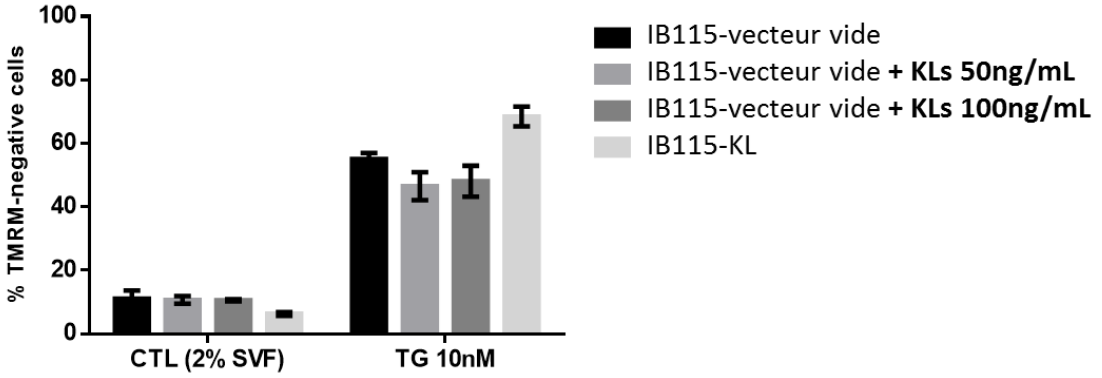


Figure 65 *Proportion de cellules mortes dans la lignée IB115 prétraitée avec KLs ou surexprimant la forme membranaire de Klotho après un traitement de 48h avec la TG*

Ces résultats sont représentatifs de plusieurs expériences. Le prétraitement avec KLs ne sensibilise pas les cellules IB115-vecteur vide au stress du RE. De plus, la différence de mort cellulaire entre la lignée contrôle et celle surexprimant *KL* est plus faible en 2% SVF car la mortalité des cellules IB115-vecteur vide est plus importante qu'en 10% SVF.

Les tests d'apoptose avec la gemcitabine ont donc été réalisés dans un milieu de culture classique, contenant 10% de SVF (**Figure 66**).

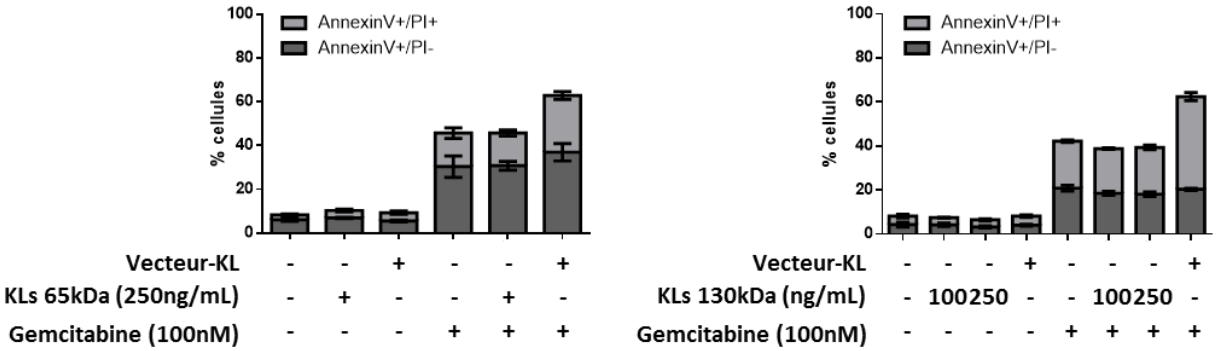


Figure 66 *Les formes solubles de Klotho n'ont pas d'effet sur l'apoptose induite par la gemcitabine*

Là encore, le prétraitement de la lignée contrôle avec les formes solubles de Klotho ne sensibilise pas à la gemcitabine (**Figure 66**).

En conclusion, les formes solubles de Klotho inhibent la réponse calcique à IGF-1, très certainement par la séquestration de TRPC6 dans les compartiments intracellulaires, mais pas l'activation de ERK1/2. De plus, elles ne modifient pas la perméabilité du translocon au Ca^{2+} et ne sensibilisent pas, dans mes conditions expérimentales, à la mort cellulaire induite par la TG ou la gemcitabine.

Il semble donc que la fuite du Ca^{2+} réticulaire par TRPC6 ne soit pas suffisante pour sensibiliser les cellules IB115 au stress du RE. En revanche, l'ouverture du translocon est nécessaire. L'inhibition d'ERK1/2 est soit due à la forme membranaire de Klotho, soit à son action intracellulaire. Elle n'est pas nécessaire pour l'internalisation de TRPC6, mais semble requise pour la régulation de la perméabilité du translocon au Ca^{2+}.

6) Confirmation des effets de Klotho dans d'autres lignées de DDLPS

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé plusieurs infections lentivirales afin d'établir d'autres lignées cellulaires de DDLPS surexprimant *KL* et de confirmer son rôle dans la chimiosensibilisation.

Cependant, les résultats concernant ces lignées sont encore préliminaires du fait d'obstacles techniques et parce que tous les aspects de la signalisation n'ont pas pu être étudiés.

Trois séries de lignées ont été établies à partir de la lignée IB143. La confirmation de l'expression de Klotho par western blot a été un succès concernant les séries 1 et 2, mais pas pour la s3, probablement à cause du manque de sensibilité de détection avec l'anticorps utilisé. De plus, l'expression est bien plus faible que dans les lignées IB115-KL établies (**Figure 67**).

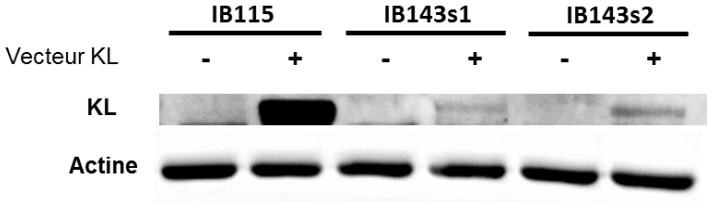


Figure 67 *Validation de l'expression de KL par western blot*

Dans les trois séries de lignée, l'effet de Klotho sur la mort induite par la gemcitabine a été confirmé (**Figure 68**).

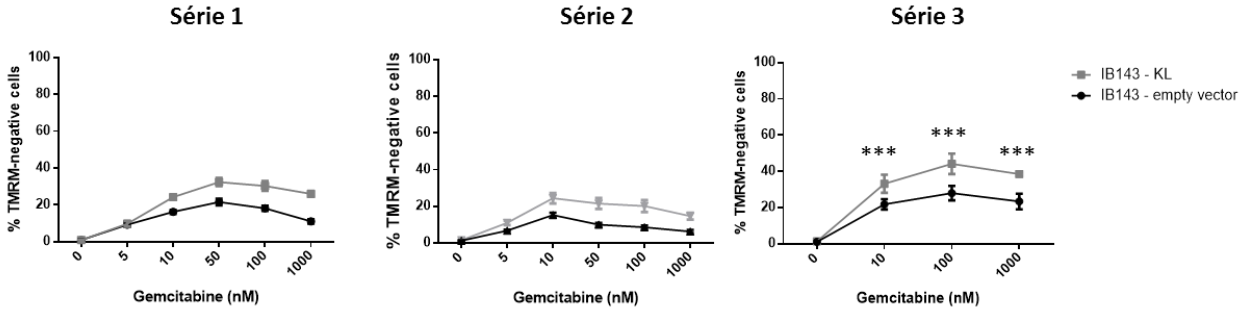


Figure 68 *La surexpression de KL sensibilise la lignée IB143 à 96h de traitement avec la gemcitabine*

Pour les deux premières séries d'infection, des résultats similaires ont été obtenus lors d'expérimentations indépendantes. Toutefois, les différences entre les deux lignées se réduisaient rapidement au fil des passages en culture cellulaires. Ceci était associé à une perte de la détection de Klotho en western blot. Pour la troisième série, dont le phénotype était plus stable, les valeurs représentent les moyennes (SD) de trois expériences indépendantes.

De même, Klotho potentialise de façon significative ($p<0.001$) l'effet de la TG sur cette lignée pourtant très résistante au stress du RE (10µM de TG pendant 72h) dans cette 3ème série de lignées (**Figure 69**).

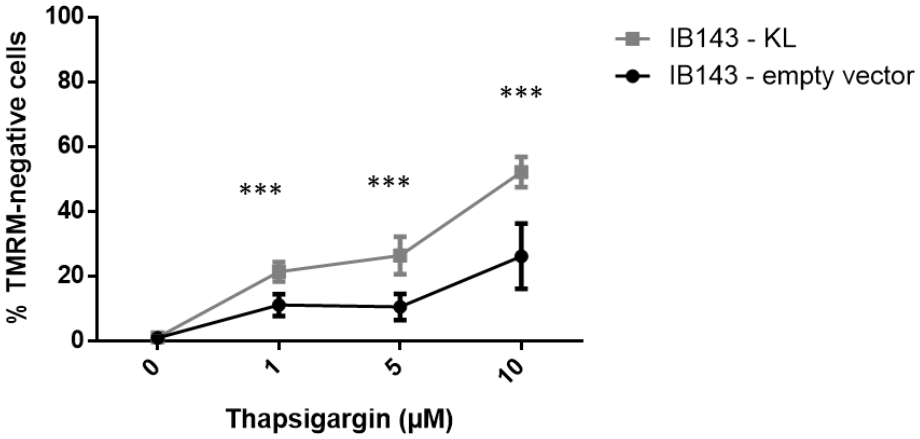


Figure 69 *La surexpression de KL sensibilise à l'apoptose induite par la TG*

Dans cette lignée cellulaire également, Klotho augmente la réponse calcique à la TG, bien que l'effet soit bien moins important que dans la lignée IB115 (**Figure 70**). De même, les effets de KLs sont confirmés dans cette 3ème série de lignées cellulaires.

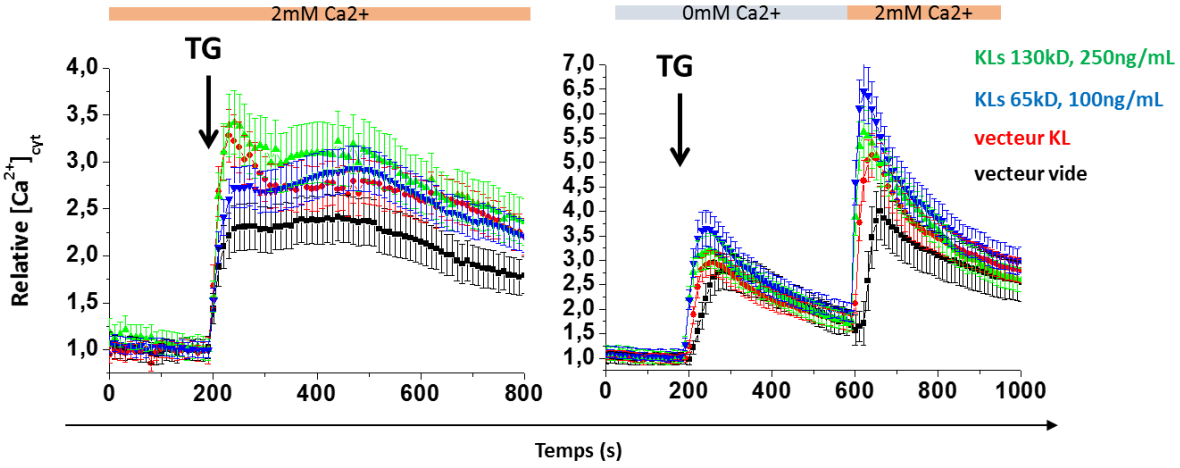


Figure 70 *Réponses calciques intracellulaires de la lignée IB143, infectée pour surexprimer KL ou prétraitée 24h avec KLs, à l'application de de TG (1µM)*

Toutefois, dans cette lignée IB143, contrairement à IB115, les phénotypes sont rapidement perdus au fil des passages, quelle que soit la série, malgré le maintien d'un phénotype résistant à la puromycine. De plus, malgré des infections lentivirales efficaces (presque aucune mort cellulaire lors de la sélection dans les puits ayant reçu les particules lentivirales), l'abondance protéique de Klotho est très inférieure à celle obtenue avec la lignée IB115. Ceci suggère donc que les cellules IB143 ont tendance à inhiber l'expression du cDNA codant pour Klotho.

D'autres stratégies devront donc être employées pour cette lignée, comme l'utilisation d'un vecteur inductible ou d'un vecteur avec un autre promoteur fort.

Les effets de la surexpression de *KL* ont été étudiés dans une autre lignée de DDLPS, la lignée IB111. Comme pour la lignée IB115, une série de lignée a subi une sélection à la puromycine, l'autre non (**Figure 71**).

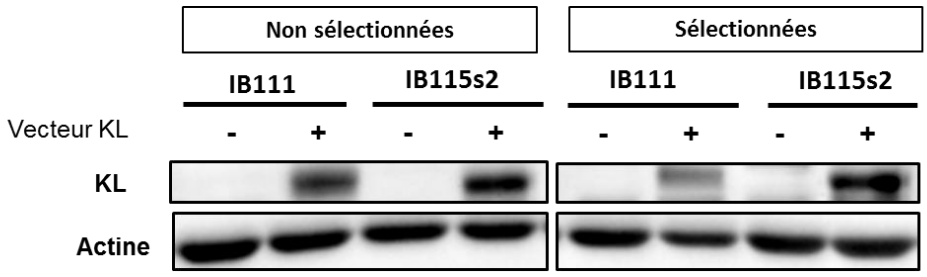


Figure 71 *Validation par western blot de l'expression de KL dans la lignée IB111*

Son effet sur la mort cellulaire induite par la TG et la gemcitabine a été vérifié par un marquage TMRM (**Figure 72**).

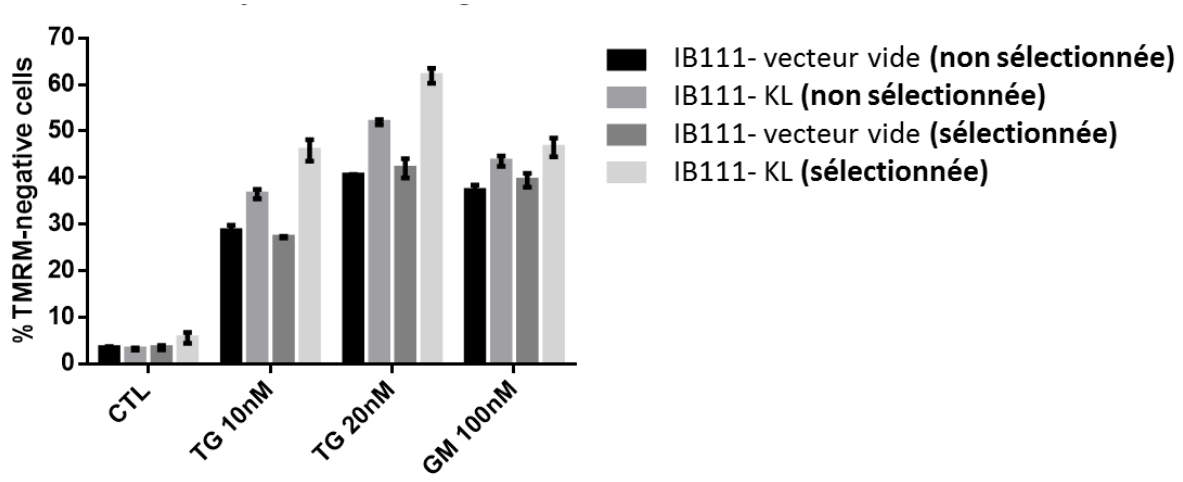


Figure 72 *La surexpression de Klotho sensibilise à la mort induite par la thapsigargine (TG), mais pas à la gemcitabine (GM)*

Ces résultats sont représentatifs de plusieurs expériences indépendantes. On constate que dans les deux lignées, sélectionnées ou non, Klotho sensibilise à l'apoptose induite par 72h d'incubation avec la TG. L'effet est plus faible dans la lignée non sélectionnée. Dans cette lignée IB111 comme dans la lignée IB143, l'expression de Klotho en western blot est réduite au fil des passages, de façon plus rapide dans la lignée non sélectionnée. D'autre part, l'effet de Klotho sur la mort induite par la gemcitabine, bien que reproductible, est faible donc négligeable.

Le reste des expériences a donc été réalisé sur les lignées IB111 sélectionnées. Les réponses calciques à la TG et à la puromycine ont été étudiées dans la lignée contrôle et celle surexprimant *KL* (**Figure 73**).

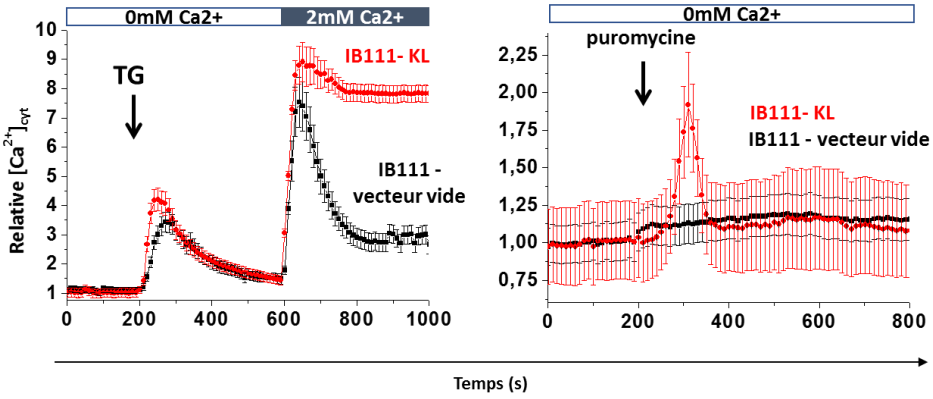


Figure 73 *Etude de l'homéostasie calcique intracellulaire de la lignée IB111, exprimant le vecteur vide ou KL.*

De façon similaire à la lignée IB115, Klotho augmente la mobilisation calcique intracellulaire, puis l'entrée capacitive, suite à une application de TG dans le milieu d'enregistrement. D'autre part, les cellules IB111-KL présentent un pic de réponse après l'ajout de puromycine. En conclusion, dans les cellules IB111 également, Klotho favorise l'ouverture du translocon et la fuite du Ca^{2+} réticulaire, bien que ses effets soient bien moindres que dans la lignée IB115. Ceci peut être mis en relation avec la surexpression moins forte dans la lignée IB111-KL par rapport aux cellules IB115-KLs1.

L'augmentation de l'entrée capacitive est très importante et maintenue dans les cellules IB111-KL en comparaison avec la lignée contrôle (**Figure 73**). Or, il a été décrit que l'entrée de Ca^{2+} par les canaux SOC favorise la résistance à la gemcitabine dans des cellules d'adénocarcinome pancréatique [390]. Dans l'hypothèse où cela expliquerait le peu d'effet de Klotho dans cette lignée, j'ai donc étudié l'impact de l'entrée capacitive sur la mort induite par

la gemcitabine dans 5 lignées de DDLPS à l'aide d'inhibiteurs (Synta66, GSK7975-A et BTP2) mais dans aucune des lignées ces inhibiteurs n'ont eu d'effet significatif sur leur réponse apoptotique (résultats non montrés).

Enfin, la réponse calcique à l'IGF-1 a été étudiée (**Figure 74**).

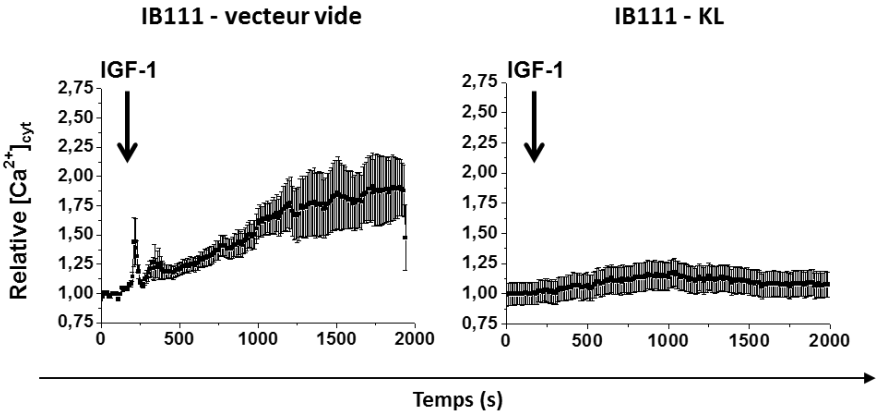


Figure 74 *Réponse calcique des lignées IB111 à la stimulation avec l'IGF-1 (20nM).*

Dans cette lignée aussi, Klotho inhibe la signalisation calcique à IGF-1. Toutefois, on constate que dans ces cellules, la sensibilité à l'IGF-1 est plus faible que dans la lignée IB115. Il est donc possible qu'une moindre activité de la signalisation dépendante d'IGF-1R explique les effets plus faibles de Klotho, en particulier sur l'ouverture du translocon et sur la réponse apoptotique à la gemcitabine.

En conclusion, le rôle de Klotho sur la fuite réticulaire induite par la TG et la sensibilisation au stress du RE est commun à plusieurs lignées de DDLPS. L'étude plus approfondie de ces lignées et l'établissement de modèles de surexpression plus forts et plus stables permettront de déterminer si les mêmes mécanismes moléculaires que pour la lignée IB115 interviennent.

L'aggravation de la fuite calcique réticulaire, associée à l'augmentation de l'entrée capacitive de Ca^{2+} et donc à une surcharge calcique mitochondriale plus importante, pourrait sensibiliser un grand nombre de DDLPS à la gemcitabine, qui stimule la fuite du Ca^{2+} réticulaire.

Ainsi, de très faibles doses de TG sensibilisent les cellules IB115 à la gemcitabine et Klotho potentialise la réponse apoptotique à cette combinaison (**Figure 75A**).

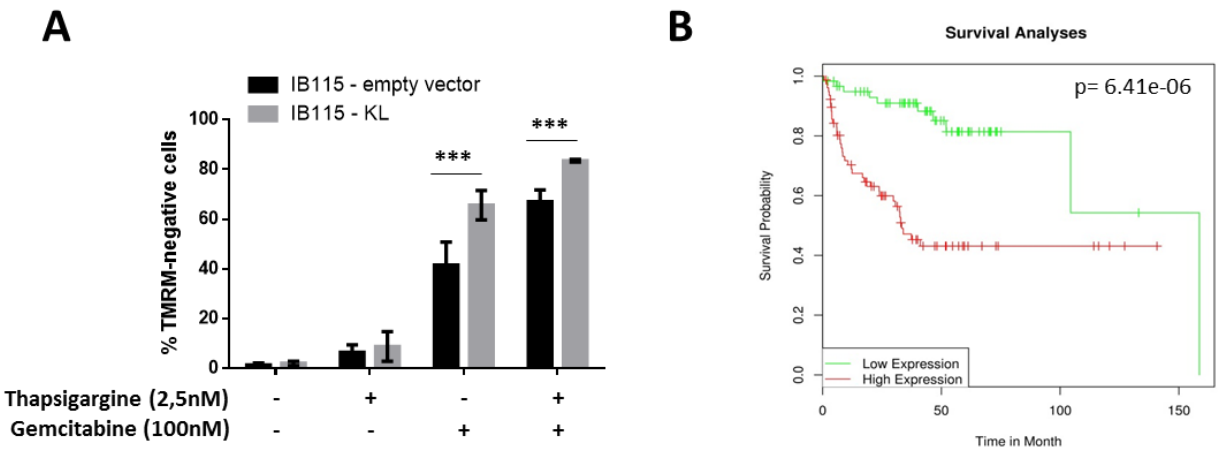


Figure 75 *Potentiel thérapeutique du ciblage des SERCA dans les LPS.* ***(A)*** *Mesure de la mort cellulaire avec la combinaison de la TG et de la gemcitabine et* ***(B)*** *Kaplan Meier de la survie des patients atteints de LPS en fonction de l'expression de la SERCA2.*

La SERCA2 est fréquemment surexprimée dans les LPS, comparé au tissu sain, et impliquée dans l'agressivité des cellules [335,336]. De plus, la base Bioprofiling, qui a permis d'obtenir les données de survie associées à l'expression de *KL* dans 137 liposarcomas analysés par puce d'expression, a mis en évidence, dans la même cohorte, parmi les gènes de l'interactome de KL, le gène de la SERCA2 (ATP2A2) dont une forte expression est significativement associée à une faible survie du patient (**Figure 75B**).

Le ciblage de la SERCA2 semble dont être une stratégie thérapeutique intéressante qui, combinée à l'action de Klotho, permettrait de sensibiliser les DDLPS aux chimiothérapies. Cette combinaison pourrait être bénéfique en particulier pour les patients avec une forte expression de la SERCA2, qui est de mauvais pronostic.

Partie 2 : Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la chimiorésistance des DDLPS à la gemcitabine

Dans la première partie des résultats de ma thèse, j'ai présenté le rôle de Klotho dans l'homéostasie calcique intracellulaire et son impact sur la sensibilité des cellules aux molécules affectant le Ca^{2+} réticulaire.

Klotho, en favorisant l'état perméable au Ca^{2+} du translocon et la présence de TRPC6 au RE, augmente la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire. Ce dernier est très certainement absorbé par les mitochondries, où il va stimuler le métabolisme et favoriser la production d'ATP nécessaire au re-pompage actif du Ca^{2+} par les Ca^{2+}-ATPases SERCA au RE. Une perturbation dans ces cellules de l'activité des pompes SERCA, du métabolisme mitochondrial ou du transfert de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie va donc réduire le contenu réticulaire en Ca^{2+} et induire un stress du RE. La perturbation de ces mécanismes peut être effectuée par l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Dans la Figure 2 de l'article soumis, on constate ainsi que les cellules IB115 surexprimant *KL* sont plus sensibles à l'ABT-737, un BH3-mimétique qui empêche les interactions impliquant le domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w.

Dans la famille Bcl-2, ce domaine BH3 permet notamment l'interaction des protéines anti-apoptotiques avec les pro-apoptotiques, afin d'éviter l'oligomérisation de Bax et Bak puis la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. D'autre part, le domaine BH3 de Bcl-xL est responsable de la régulation du récepteur IP3R. Bcl-xL sensibilise l'IP3R à de faibles concentrations d'IP3, et augmente ainsi les oscillations induites par de faibles concentrations d'agoniste. Par ailleurs, Bcl-2 s'associe avec Beclin1 grâce à leurs domaines BH3 respectifs et inhibe l'initiation de l'autophagie.

Les protéines anti-apoptotiques, *via* leur domaine BH3, sont donc impliquées dans la résistance à l'apoptose, l'autophagie et le métabolisme énergétique. Nous avons également montré qu'elles étaient essentielles à la migration des cellules mammaires cancéreuses induite par le ligand clivé de CD95 et dépendante du Ca^{2+}.

La base de données cBioportal (www.cbioportal.org) permet d'exploiter les données d'expression au niveau protéique concernant les protéines Bcl-2 et Bcl-xL dans la cohorte de sarcomes des tissus mous du TCGA (The Cancer Genome Atlas) (**Figure 76**).

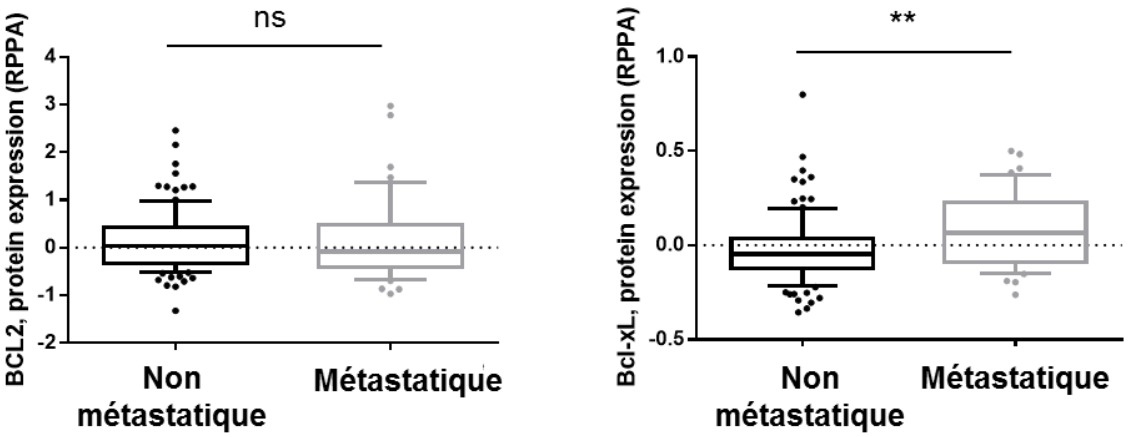


Figure 76 *Résultats de puces protéiques en phase reverse (RPPA) pour étudier l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL dans les STM en fonction du statut métastatique. Les données sont issues du TCGA et analysées par la base de données cBioPortal (la ligne au milieu est la médiane, les barres d'erreurs correspondent aux 10^{e} et 90^{e} centiles)*

Sur les 147 sarcomes des tissus mous analysés, parmi lesquels 20 tumeurs de DDLPS, on constate que l'expression de Bcl-xL, mais pas celle de Bcl-2, est significativement (p=0.0061) plus élevée dans le groupe des tumeurs métastatiques. Ceci suggère qu'une forte expression de Bcl-xL offre un avantage sélectif au cours de la progression tumorale et que les tumeurs métastatiques manifestent peut-être une plus grande dépendance vis-à-vis de Bcl-xL.

Au cours de ma thèse, j'ai donc voulu évaluer le rôle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la réponse au traitement des DDLPS grâce à l'utilisation d'inhibiteurs ciblant leur domaine BH3, les BH3-mimétiques.

Des BH3-mimétiques ont été développés afin d'inhiber spécifiquement les domaines BH3 des protéines anti-apoptotiques. L'ABT737 et son équivalent administrable par voie orale, l'ABT-263 (navitoclax), inhibent Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, tandis que l'ABT-199 (venetoclax) cible exclusivement le domaine BH3 de Bcl-2. L'ABT-263 et l'ABT-199 font l'objet d'essais cliniques sur les cancers hématologiques et les tumeurs solides [271]. Leur action principale est mitochondriale, par la libération des protéines pro-apoptotiques de leur interaction avec les anti-apoptotiques. Par ailleurs, dans les plaquettes humaines, il a été montré que l'incubation sur plusieurs heures avec l'ABT-737 réduit dramatiquement le contenu réticulaire en Ca^{2+}, certainement par la perturbation des flux de Ca^{2+} par l'IP3R [391]. Il existe également le A-

1210477, un BH3-mimétique spécifique de Mcl-1 dont l'utilisation n'a pas encore dépassé le stade préclinique.

La gemcitabine est généralement administrée aux patients atteints de LPS de façon palliative et après l'échec des traitements à base d'anthracycline (doxorubicine), elle concerne donc principalement les cas avancés et/ou métastatiques de LPS. De plus, la perturbation par Klotho de l'homéostasie calcique ne sensibilise les cellules de DDLPS qu'à la gemcitabine et non à la doxorubicine. J'ai donc testé la combinaison de la gemcitabine avec l'ABT-263 (Navitoclax) sur les lignées cellulaires disponibles au laboratoire. L'ensemble des expériences *in vitro* a été réalisé sur les lignées non transformées IB111, IB115, IB143, LPS78 et LPS80.

Chacune de ces lignées est issue d'un fragment de tumeur de patient, mis en culture par l'équipe de F. CHIBON (INSERM U1218, Institut Bergonié).

En premier lieu, j'ai évalué la sensibilité de chacune de ces lignées à la gemcitabine par des tests de viabilité pour identifier les plus résistantes d'entre elles. Afin d'évaluer la pertinence de l'utilisation de l'ABT-263, j'ai étudié l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Dans un second temps, j'ai mesuré la proportion de cellules ayant perdu leur potentiel mitochondrial et la population de cellules apoptotiques/nécrotiques après un traitement combinant la gemcitabine et l'ABT-263. Ensuite, l'efficacité de la combinaison thérapeutique a été testée *in vivo* sur des xénogreffes de DDLPS. Enfin, le rôle potentiel de Mcl-1 dans la résistance au traitement combinant la gemcitabine et l'ABT-263 a été évalué.

1) Evaluation de la sensibilité des lignées de DDLPS à la gemcitabine

Afin d'évaluer la sensibilité à la gemcitabine de chacune des lignées de DDLPS, les cellules ont été traitées 72h avec une large gamme de concentrations de gemcitabine puis la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un test MTT (**Figure 77**).

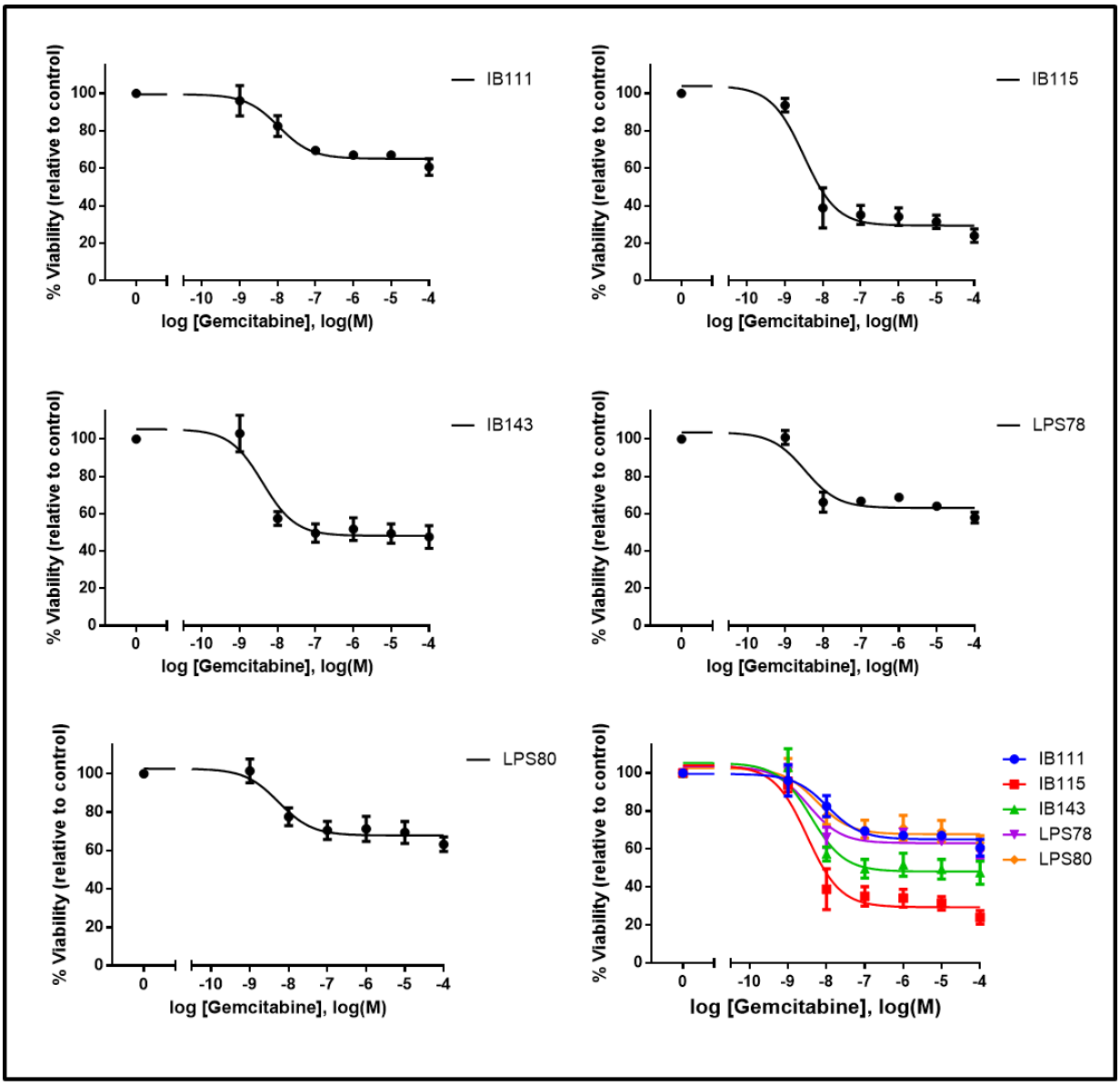


Figure 77 *Mesure de la viabilité cellulaire des lignées de DDLPS en fonction de la concentration de gemcitabine, par test MTT*

On constate, pour chacune des lignées, l'existence d'un plateau à partir de 100nM au-delà duquel la mort cellulaire varie peu, malgré les fortes concentrations de gemcitabine testées (jusqu'à 100µM). Ce plateau reflète un phénomène de résistance à la gemcitabine dans ces lignées cellulaires.

Grâce aux profils des courbes de dose-réponse, on peut classer les lignées en trois catégories : très sensibles (IB115), intermédiaires (IB143) et résistantes (IB111, LPS78 et LPS80).

2) Etude de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans les lignées de DDLPS

L'abondance des protéines Bcl-2 et Bcl-xL a été étudiée par Western blot afin d'évaluer la dépendance relative des lignées cellulaires de DDLPS vis-à-vis de ces anti-apoptotiques (**Figure 78**).

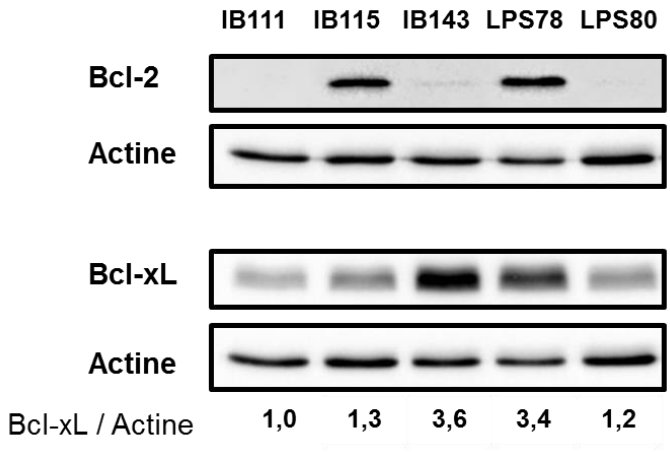


Figure 78 *Etude par western blot de l'abondance protéique de Bcl-2 et Bcl-xL dans les différentes lignées de DDLPS*

L'expression de Bcl-2 est détectée uniquement dans les lignées IB115 et LPS78. Un signal très faible est également discernable dans les cellules IB143.

La protéine Bcl-xL, en revanche, est exprimée dans toutes les lignées, de façon comparable dans les lignées IB111, IB115 et LPS80, mais plus fortement dans les lignées IB143 et LPS78.

Il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'expression des protéines anti-apoptotiques et la sensibilité des cellules à la gemcitabine déterminée grâce aux tests de viabilité. Toutefois, la gemcitabine est un antimétabolite pyrimidique qui induit à la fois un arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire, principalement *via* l'inhibition de la synthèse d'ADN. Le taux de viabilité observé est donc la résultante entre l'apoptose des cellules et l'arrêt de leur prolifération. Il est très probable que le rôle des protéines Bcl-2 et Bcl-xL se situe principalement au niveau de la mort cellulaire. Les expériences suivantes visent donc à mesurer leur implication dans la résistance à la mort cellulaire induite par la gemcitabine grâce à l'utilisation de l'ABT-263.

En clinique, l'ABT-263 (Navitoclax) entraîne une thrompocytopénie (chute du taux des plaquettes sanguines) transitoire, du fait du rôle de Bcl-xL dans l'activation des plaquettes. Cet

effet secondaire est évité grâce à l'ABT-199 (Venetoclax), spécifique de Bcl-2. Toutefois, l'absence d'expression de Bcl-2 dans certaines lignées montre qu'il n'est pas pertinent d'utiliser l'ABT-199 dans le cadre d'une thérapie contre les DDLPS. Ceci a été confirmé par un marquage au TMRM des lignées incubées avec la gemcitabine et l'ABT-199 (**Figure 79**).

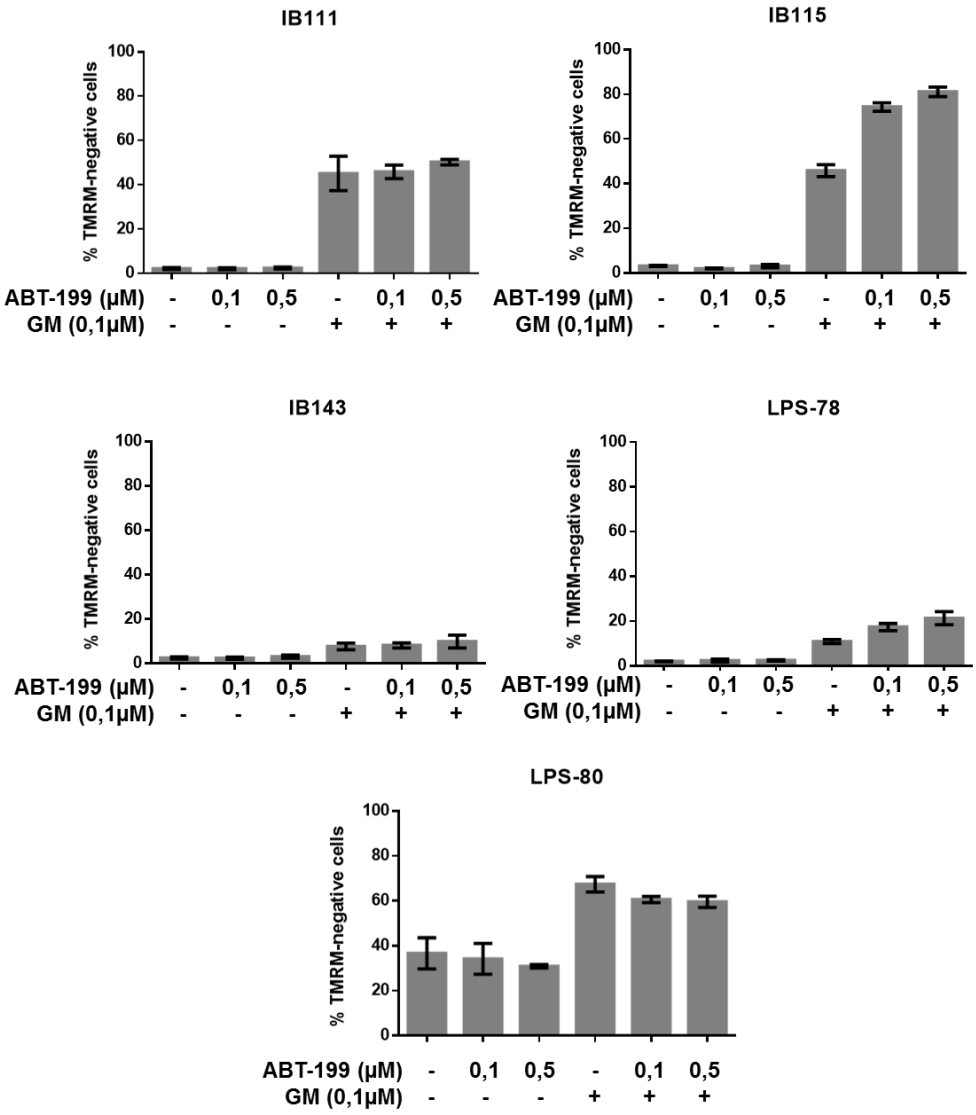


Figure 79 *Mesure de la mort cellulaire par marquage TMRM dans les lignées de DDLPS traitées avec la combinaison de l'ABT-199 et de la gemcitabine*

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux du blot : la réponse apoptotique à la gemcitabine n'est pas modifiée par l'ajout d'ABT-199 dans lignées n'exprimant pas ou peu Bcl-2 (IB111, IB143 et LPS80). Un effet de sensibilisation important est observé dans les cellules IB115, mais concernant les cellules LPS78 qui expriment également Bcl-2, il est négligeable.

3) Effet de la combinaison de l'ABT-263 et de la gemcitabine sur la mort cellulaire *in vitro*

Après avoir été traitées 72h avec soit de l'ABT-263, soit de la gemcitabine, soit la combinaison des deux, la proportion de cellules ayant perdu leur potentiel mitochondrial est évaluée à l'aide d'un marquage TMRM (**Figure 80**).

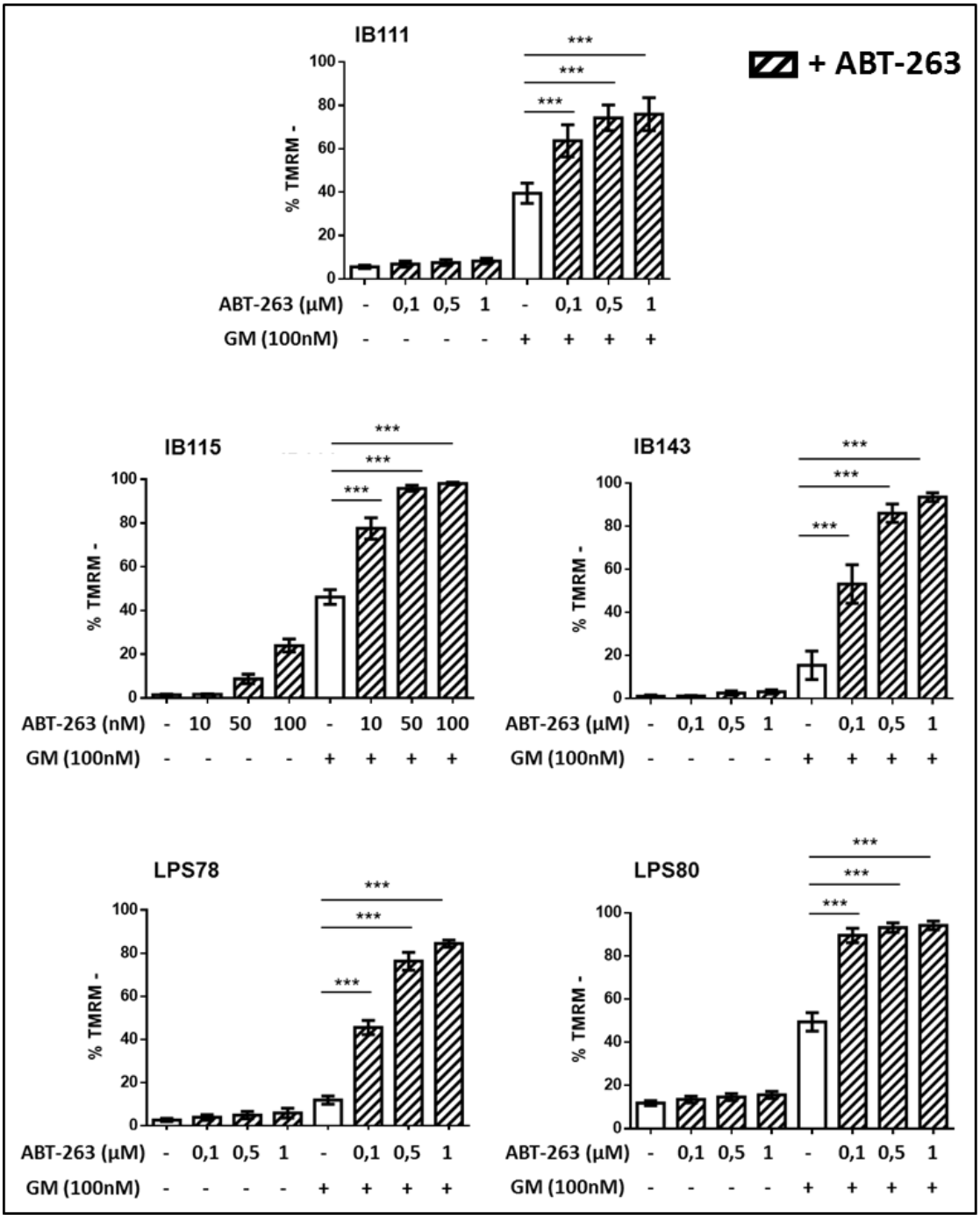


Figure 80 *Etude de l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine (GM) et de l'ABT-263 dans les lignées cellulaires de DDLPS par un marquage TMRM analysé par cytométie en flux*

En premier lieu, il est à noter que la lignée cellulaire IB115 est la seule dans laquelle l'ABT-263 (en agent seul) provoque la mort cellulaire de façon notable. C'est pourquoi ces cellules sont traitées avec 10, 50 ou 100nM d'ABT-263, tandis que les autres lignées ont été incubées avec 0.1, 0.5 ou 1µM d'ABT-263 au maximum, afin d'éviter des effets aspécifiques de la molécule. La lignée IB115 mise à part, les effets de l'ABT-263 seul sont négligeables sur la mort basale des cellules.

D'une part, on constate une différence entre les résultats obtenus lors des tests MTT et les taux de cellules négatives pour le marquage au TMRM, qui correspondent aux cellules mortes. En effet, les lignées cellulaires IB111, IB115 et LPS80 présentent des taux de mort cellulaire similaires (respectivement 39.5%, 46% et 49%) après 72h d'incubation avec 100nM de gemcitabine. En revanche, les lignées cellulaires IB143 et LPS78 ont chacune une proportion de cellules apoptotiques en moyenne respectivement égale à 15% et 12%. Il semble donc que l'arrêt de la prolifération soit le mécanisme prédominant dans la réponse des cellules IB143 à la gemcitabine, tandis que les cellules IB111 et LPS80 poursuivent leur cycle cellulaire, incorporant la gemcitabine, ce qui augmente l'apoptose. Les cellules IB115, plus sensibles que les autres lignées cellulaires, présentent à la fois un arrêt du cycle cellulaire et une forte apoptose.

D'après ce test de mort cellulaire, le degré de sensibilité des lignées cellulaires de DDLPS à l'apoptose induite par la gemcitabine les divise en deux groupes :

- Les lignées IB111, IB115 et LPS80 sont les plus sensibles
- Les lignées IB143 et LPS78 sont les plus résistantes.

On constate donc que les lignées cellulaires les plus résistantes à la mort cellulaire sont celles exprimant le plus fortement Bcl-xL, suggérant qu'il s'agit de l'acteur majeur de la résistance à la gemcitabine.

D'autre part, la combinaison ABT-263/gemcitabine augmente de façon significative la mort cellulaire, avec un effet dose-dépendant et plus qu'additif. Même dans les lignées IB143 et LPS78, les plus résistantes à la mort cellulaire, la proportion de cellules négatives pour le marquage au TMRM atteint respectivement 93.5% et 84.5% en moyenne à 1µM d'ABT-263. Les plus résistantes à la combinaison sont les cellules IB111, avec encore 25% de cellules viables en moyenne pour la concentration la plus élevée. Une explication possible est que la lignée IB111 exprimant plus faiblement Bcl-xL que les autres et n'exprimant pas Bcl-2, ces

cellules sont moins dépendantes des anti-apoptotiques et donc l'ABT-263 a relativement moins d'efficacité.

Ces résultats ont été confirmés pour chacune des lignées par un marquage à l'AnnexineV et à l'iodure de propidium (**Figure 81**).

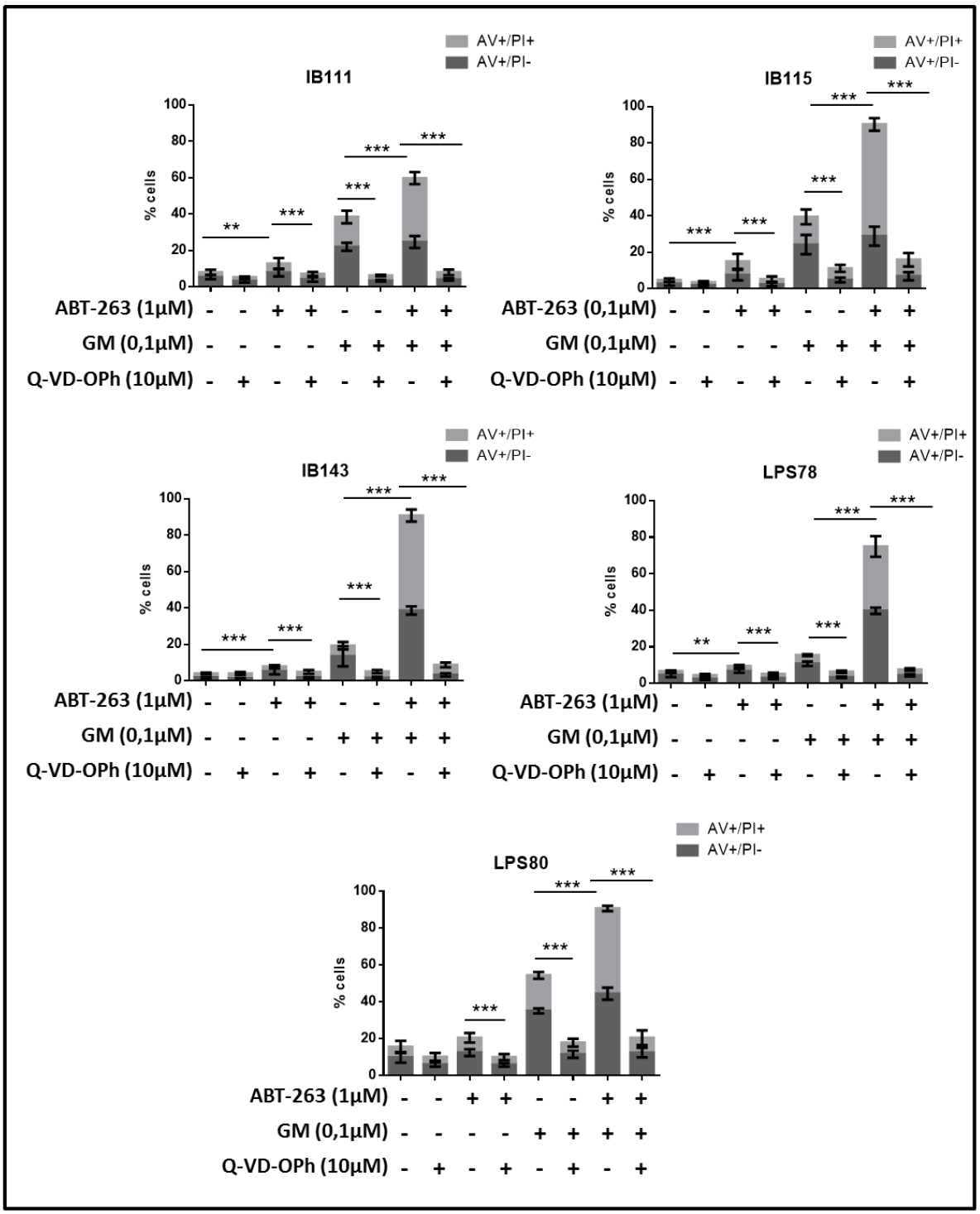


Figure 81 *Etude de l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine (GM) et de l'ABT-263 dans les lignées cellulaires de DDLPS par un marquage AnnexineV/PI*

On constate que les proportions de cellules apoptotiques/nécrotiques sont similaires à celles obtenues par le marquage au TMRM. Ici encore, pour chacune des lignées, l'ABT-263 potentialise de façon significative l'apoptose induite par la gemcitabine. La lignée IB111 est celle qui semble tirer le moins de bénéfice de la combinaison, avec 60% environ de cellules en mort cellulaire. D'autre part, le prétraitement avec l'inhibiteur des caspases, le QVD-OPh, ramène pratiquement la mort cellulaire au niveau basal. Ceci démontre que le mécanisme par lequel l'ABT-263 sensibilise les cellules est caspase-dépendant. La combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 favorise donc l'apoptose plutôt que la nécrose, cette dernière étant une mort cellulaire qui poserait problème dans le cadre d'un développement clinique de la combinaison.

4) Effet de la combinaison de l'ABT-263 et de la gemcitabine sur la croissance tumorale *in vivo*

La lignée IB115 est la seule lignée de DDLPS dont l'implantation avait déjà été réalisée avec succès dans l'unité. Pour les tests pré-cliniques de l'efficacité de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263, j'ai injecté dans le flanc de souris Rag γ 2C-/-. Ce modèle murin immunodéprimé est particulièrement adapté à l'implantation de cellules tumorales car dépourvu de lymphocytes B, T et de cellules NK.

Pour les pré-tests de toxicité, j'ai choisi trois schémas de traitement trouvés dans la littérature qui étaient les moins fortement dosés mais efficaces dans d'autres modèles de cancer, afin d'éviter une souffrance des souris (**Figure 82**). De plus, ces schémas se rapprochent du protocole utilisé lors de l'essai clinique de la gemcitabine en combinaison avec le navitoclax sur les patients atteints de tumeurs solides.

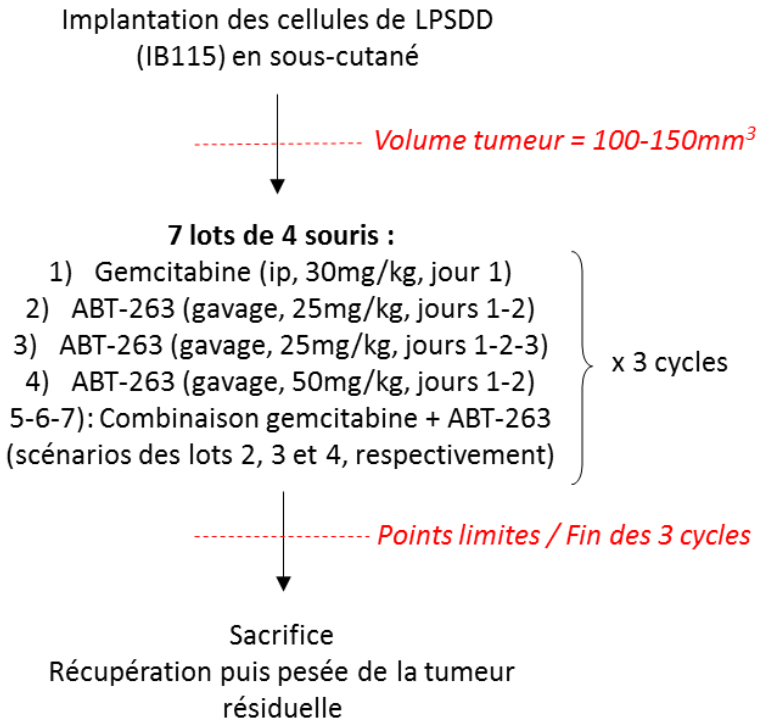


Figure 82 *Design expérimental des pré-tests de toxicité in vivo*

Sur la **Figure 82**, un cycle correspond à une semaine. Les points éthiques limites sont les manifestations physiques suivantes : perte de 10% du poids, cachexie, lésions corporelles, comportement altéré, tumeur à 5% du poids, nécrose, ulcération… ou autres signes de mal-être.

Certaines souris n'ont pas développé de tumeurs, ce qui a réduit le nombre de souris traitées dans certains groupes. Après les trois semaines de traitement, la combinaison avec l'ABT-263 à 50mg/kg a semblé être la seule à avoir un effet sur le taux de croissance tumorale par rapport aux autres groupes traités avec la gemcitabine (ratio environ égal à 3 en moyenne contre 4.75, respectivement).

L'expérimentation définitive a donc été réalisée en suivant le schéma illustré sur la **Figure 83**.

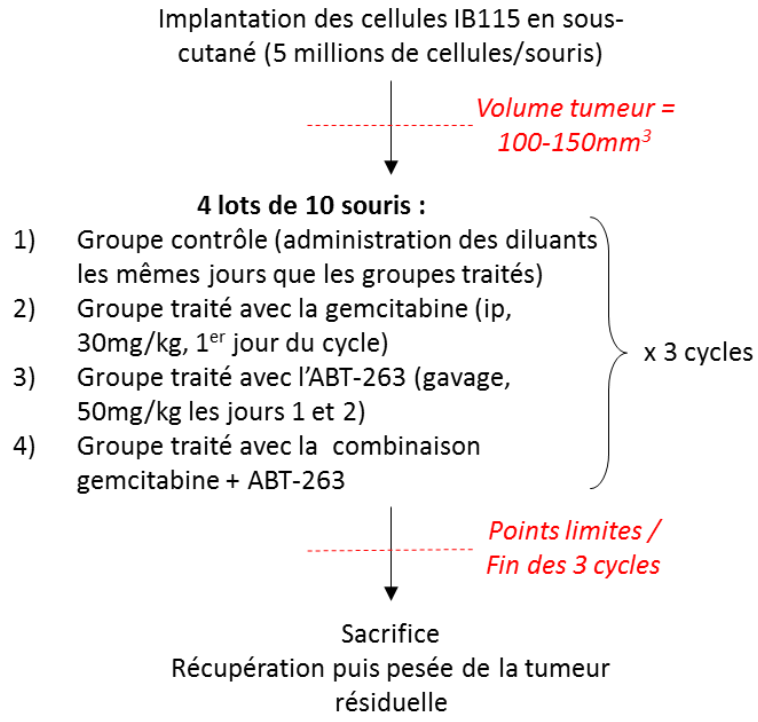


Figure 83 *Design expérimental du test de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 in vivo*

Au cas où certaines souris ne développeraient pas de tumeur, quatre souris supplémentaires ont reçu une injection. La prise en greffe des tumeurs n'étant pas homogène, les souris ont été réparties en quatre groupes avec une distribution similaire en termes de volume tumoral. Les groupes ont été traités en même temps lorsque la moyenne des volumes tumoraux a atteint 150mm^3 environ.

Les résultats obtenus après les trois semaines de traitement sont présentés en **Figure 84**.

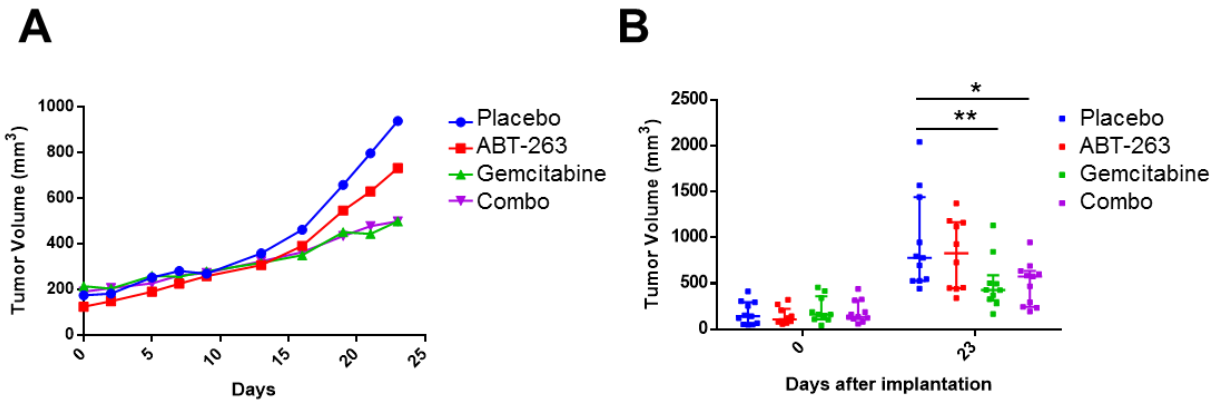


Figure 84 *Evolution du volume tumoral au cours du traitement représentée avec* ***(A)*** *les moyennes et* ***(B)*** *la médiane et l'écart interquartile pour chaque groupe de traitement.*

Par souci de lisibilité, seules les moyennes sont représentées sur la **Figure 84A**. On constate que le traitement avec la combinaison a un effet similaire à celui de la gemcitabine seule sur l'évolution de la croissance tumorale.

Les deux traitements ont réduit de façon significative le volume tumoral **(Figure 84B)**, mais il n'y a pas de différence significative entre les groupes traités avec la gemcitabine seule ou le combo. Le traitement avec l'ABT-263 seul n'a pas d'effet significatif en comparaison avec le groupe ayant reçu les placebos.

Toutefois, le volume tumoral mesuré sur les souris n'est pas le reflet exact de la taille de la tumeur. Ce point est d'autant plus important ici que certaines tumeurs avaient des formes atypiques (en filaments) et la plupart étaient mobiles lorsqu'elles étaient manipulées, ce qui affectait la robustesse des mesures. Après sacrifice, les tumeurs ont donc été prélevées et pesées (**Figure 85**).

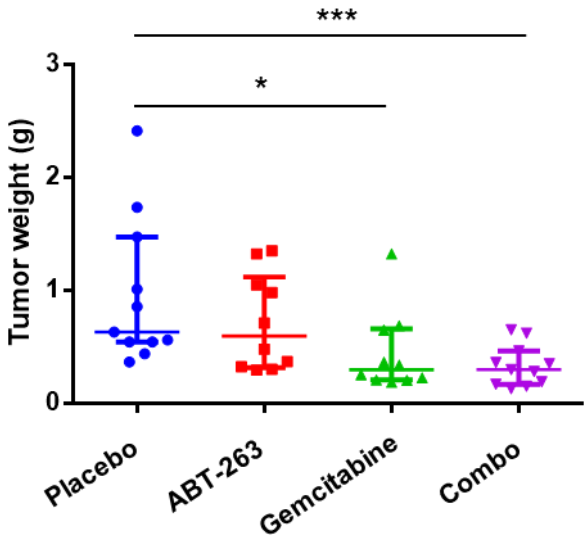


Figure 85 *Poids des tumeurs résiduelles après sacrifice (la ligne au milieu est la médiane, les barres d'erreurs correspondent à l'écart interquartile)*

La masse tumorale confirme que l'ABT-263 seul n'a pas d'effet significatif et que les deux autres traitements réduisent de façon significative la masse tumorale. Il semble y avoir une tendance en faveur du traitement avec l'ABT-263, avec en moyenne 0.443g (+/- 0.358) pour la gemcitabine seule et 0.334g (+/-0.181) pour le combo, mais la différence n'est pas significative, notamment du fait de l'importante dispersion des valeurs. Ces résultats ne permettent donc pas de vérifier l'efficacité de la combinaison des deux drogues *in vivo*.

Sur la **Figure 86**, on constate que le poids des souris n'est pas affecté par le traitement avec l'ABT-263.

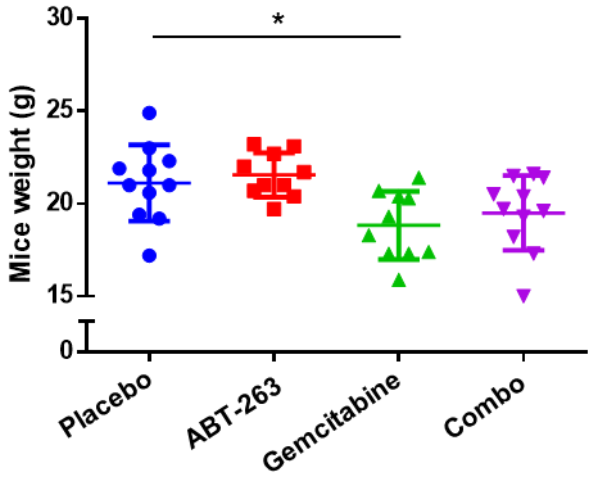


Figure 86 *Poids des souris de chaque groupe à la fin du traitement (la ligne au milieu est la moyenne, les barres d'erreurs correspondent à la SD)*

En effet, seule la gemcitabine entraîne une perte de poids significative. De plus, les souris traitées avec le combo n'ont pas particulièrement manifesté de mal-être ou de souffrance. Tout ceci suggère que le traitement a été bien toléré et que des doses plus importantes d'ABT-263 pourront être testées lors de prochaines expérimentations animales.

5) Evaluation de l'implication éventuelle de Mcl-1 dans la résistance à l'ABT-263

Dans les essais cliniques qui ont été conduits avec l'ABT-263, il a été montré que les patients qui bénéficiaient le plus du traitement étaient ceux avec un profil d'expression Bcl-2^{fort}/Mcl-1^{faible}. En effet, la protéine anti-apoptotique Mcl-1 peut compenser l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-xL et jouer un rôle majeur dans la résistance à l'ABT-263.

J'ai donc étudié, dans chacune des lignées de DDLPS, le rôle de Mcl-1 dans la réponse à la mort induite soit par la gemcitabine, soit par sa combinaison avec l'ABT-263, grâce à l'inhibiteur A-1210477, spécifique de Mcl-1 (**Figure 87**).

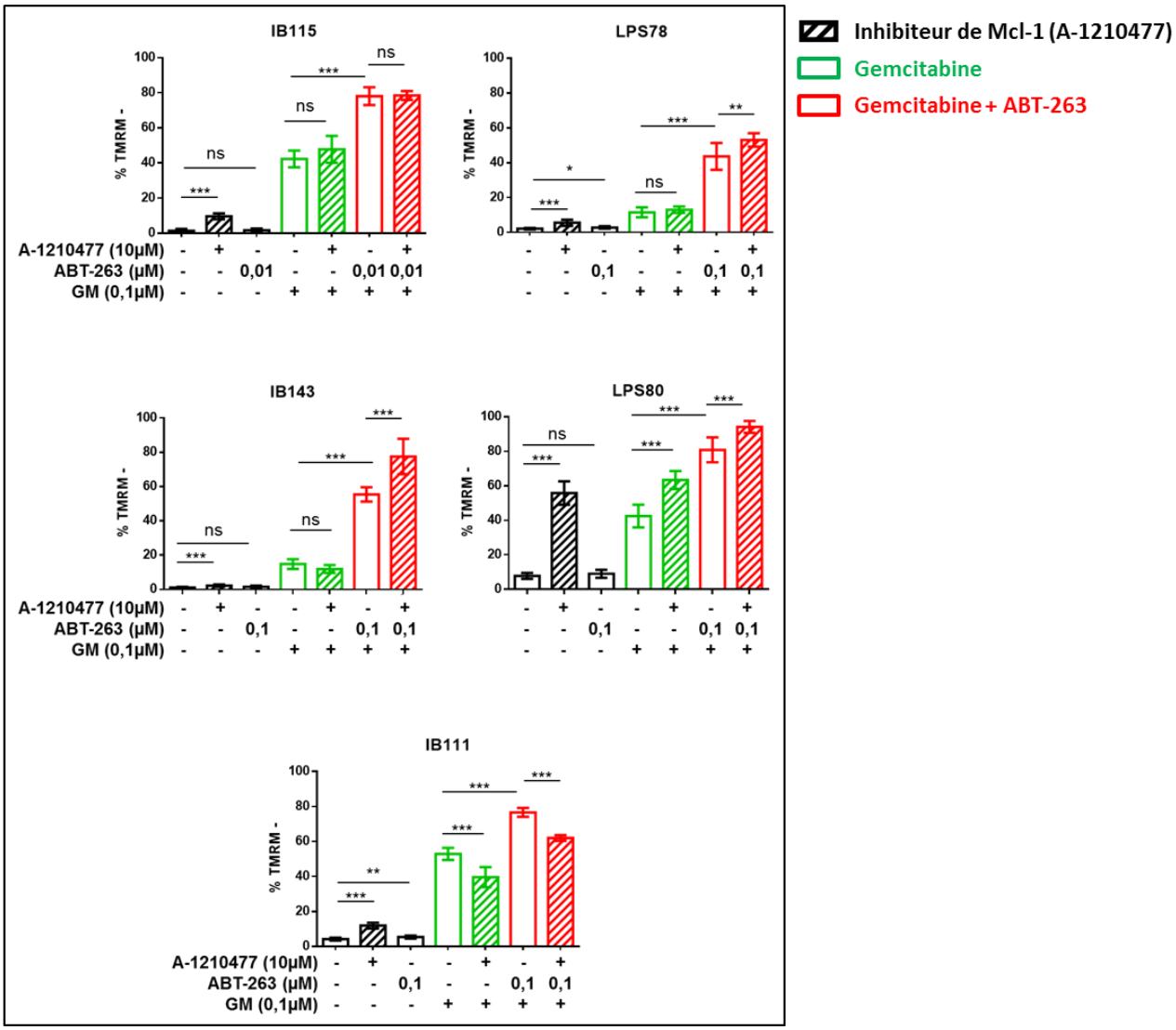


Figure 87 *Effet de l'inhibition de Mcl-1 sur la mort cellulaire induite par la gemcitabine ou sa combinaison avec l'ABT-263, mesuré par un marquage TMRM*

On constate ainsi que dans la lignée IB111, l'inhibition de Mcl-1 réduit de façon significative la mort induite par la gemcitabine (en moyenne 53% *vs* 40%, sans ou avec A-1210477, respectivement) et par la combinaison de la gemcitabine avec l'ABT-263 (en moyenne 77% *vs* 62%, sans ou avec A-1210477, respectivement), malgré un effet inverse sur la mort basale des cellules. Dans les lignées IB115, IB143 et LPS78, l'inhibition de Mcl-1 n'a pas d'effet sur la mort induite par la gemcitabine. Les lignées IB115 et LPS78 ne tirent pas de bénéfice notable de l'ajout de A-1210477 en plus du traitement avec la combinaison, contrairement à la lignée IB143 dont le pourcentage de cellules négatives pour le marquage au TMRM passe de 55% à 77% en moyenne. La lignée LPS80 se révèle extrêmement sensible à l'inhibiteur de Mcl-1 en conditions basales. Le A-1210477 augmente significativement la mort induite par les différents traitements dans cette lignée.

Pour comprendre l'effet protecteur de l'inhibition de Mcl-1 dans la lignée IB111, j'ai étudié son expression par western blot (**Figure 88**).

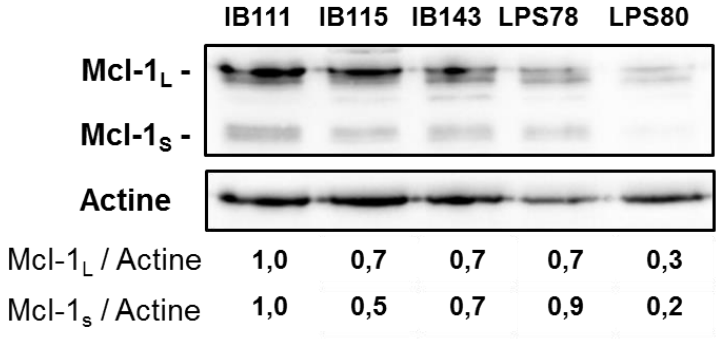


Figure 88 *Etude par western blot de l'expression de Mcl-1 dans les lignées de DDLPS*

Sur la membrane, on distingue la forme anti-apoptotique de Mcl-1 à 40kDa (Mcl-1_L), mais également la forme Mcl-1_S à 32kDa, un variant issu de l'épissage alternatif. L'isoforme Mcl-1s ne possède que le domaine BH3 et peut se dimériser avec la forme Mcl-1L. Contrairement à Mcl-1_L, Mcl-1_S a une action pro-apoptotique. Il est à noter que le composé A-1210477 inhibe Mcl-1 *via* son domaine BH3, cet inhibiteur affecte donc *a priori* Mcl-1_L et Mcl-1_S, bien que je n'aie pas trouvé d'information sur ce point dans la littérature scientifique.

Ici on constate que la lignée IB111 expriment le plus fortement Mcl-1_S que les autres lignées tandis qu'elle est à peine détectable dans la lignée LPS80. Dans le cadre du projet concernant Klotho, j'avais pu constater que l'abondance de la forme Mcl-1_L diminuait lors du traitement avec la gemcitabine dans les cellules IB115, tandis que la forme Mcl-1_S était préservée (données préliminaires non montrées). Il est donc possible que dans les cellules IB111, la relative forte expression de Mcl-1_S entraîne un rôle protecteur du A-1210477 vis-à-vis de la gemcitabine.

A l'inverse, dans les cellules LPS80, la forme majoritaire est l'anti-apoptotique Mcl-1_L, comme le confirme la forte apoptose basale (56%) en présence d'A-1210477 seul. L'hypothèse d'une induction de Mcl-1_S et d'une réduction de Mcl-1_L au cours du traitement avec la gemcitabine expliquerait donc que l'A-1210477 n'ait pas d'effet additif sur la mort induite par la gemcitabine dans les cellules LPS80.

En conclusion, la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 démontre une forte efficacité *in vitro* sur l'induction de la mort cellulaire dans les lignées de DDLPS. La protéine anti-apoptotique Mcl-1 ne semble pas représenter un risque majeur de résistance à cette combinaison thérapeutique.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives sur le rôle de Klotho dans la chimiorésistance des DDLPS

Dans cette partie consacrée au rôle de Klotho dans une lignée de DDLPS, j'ai pu montrer que sa surexpression inhibait l'hyperactivation d'ERK1/2 par IGF-1 et par conséquent, induisait une fuite constitutive Ca^{2+} réticulaire par l'ouverture du translocon et la séquestration de TRPC6 au RE. Cette fuite constitutive de Ca^{2+} sensibilise les cellules de DDLPS à l'apoptose induite par les molécules favorisant le stress calcique du RE.

1) Rôles respectifs des formes solubles et membranaire de Klotho

La sensibilisation aux inducteurs du stress réticulaire est entraînée par la surexpression de la forme membranaire de Klotho uniquement. L'étude de l'apoptose et de l'homéostasie calcique intracellulaire montre que les formes solubles (KLs), possédant soit les domaines KL1 et KL2 (130kDa) soit uniquement KL1 (65kDa), sont capables :

- **d'augmenter l'entrée capacitive de Ca^{2+}**, peut-être par la déglycosylation de canaux à la surface des cellules. Mes résultats suggèrent cependant que l'entrée capacitive de Ca^{2+} ne semble pas avoir un rôle majeur dans la sensibilité des lignées cellulaires de DDLPS à la gemcitabine.
- **de maintenir TRPC6 dans les compartiments intracellulaires**, dont il reste à déterminer s'il s'agit de vésicules d'exocytose proches de la membrane plasmique, comme décrit dans la littérature, ou s'il est séquestré dans des fractions réticulaires où il peut agir comme un canal de fuite. La mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire en réponse à la thapsigargine (TG) est augmentée dans les cellules prétraitées avec KLs. Ceci suggère donc que KLs pourrait favoriser la fuite de Ca^{2+} réticulaire par TRPC6, même si les effets sont bien moindres que ceux de la surexpression de la forme membranaire de Klotho.
- **d'inhiber la réponse calcique à IGF-1**, sans doute du fait de l'inhibition de l'exocytose de TRPC6.

Toutefois, les formes solubles sont incapables de favoriser l'ouverture du translocon. En conséquence, la présence de KLs dans le milieu extracellulaire ne sensibilise pas la lignée cellulaire de DDLPS à la mort induite par la TG ou la gemcitabine.

Ceci suggère que les mécanismes de chimiosensibilisation décrits sont dus soit à une action spécifique de la forme membranaire, soit à la localisation intracellulaire de Klotho.

Afin de le confirmer, il sera nécessaire d'établir des lignées exprimant stablement chacune une forme soluble (celle à 130kDa ou celle à 65kDa, avec des vecteurs contenant les cDNA correspondants) et de comparer leurs phénotypes à ceux de la lignée exprimant la forme membranaire : l'homéostasie calcique, la chimiosensibilité et la prolifération.

De plus, la localisation intracellulaire des différentes formes de Klotho devra être précisée par immunofluorescence. Une éventuelle interaction directe de Klotho avec le translocon ou TRPC6 pourrait être validée par immunoprécipitation.

L'ensemble des résultats, avec les formes membranaire et solubles, devra être confirmé dans d'autres lignées de DDLPS. Etant donné la difficulté de maintenir l'expression du gène dans les lignées cellulaires autres qu'IB115 malgré le succès des infections lentivirales, il faudra envisager d'utiliser des vecteurs inductibles pour exprimer *KL*. En effet, il semble que son expression constitutive entraîne un désavantage sélectif dans les conditions de culture cellulaire.

2) Rôle de la séquestration de TRPC6 par Klotho

Les résultats montrent que la localisation intracellulaire du canal TRPC6 favorisée par Klotho participe à la déplétion du Ca^{2+} réticulaire induite par la TG.

Néanmoins, les observations faites avec KLs suggèrent que la localisation intracellulaire de TRPC6 n'est pas suffisante pour la sensibilisation des cellules DDLPS au stress du RE.

Son implication dans l'apoptose induite par le stress du RE n'a pas pu être confirmée par l'emploi de son inhibiteur, le larixyl acetate, car ce dernier n'est pas spécifique des canaux à la membrane plasmique ou intracellulaires. Or, dans les IB115-vecteur vide, TRPC6 à la membrane semble avoir un rôle pro-survie au cours du traitement avec la TG. Afin de préciser le rôle de TRPC6 vis-à-vis du stress du RE, il pourra être intéressant à l'avenir de comparer la fuite de Ca^{2+} et la chimiorésistance dans des cellules exprimant une forme de TRPC6 adressée uniquement soit au RE, soit à la membrane plasmique.

En outre, il est encore inconnu si KLs induit la séquestration de TRPC6 dans les mêmes compartiments que la forme membranaire. La localisation intracellulaire de TRPC6 doit donc être précisée dans les cellules IB115-KL. Cet aspect fait actuellement l'objet d'une

collaboration avec Dr. Sylvie BIDAULT-DUCREUX (INSERM U1060, Lyon) et vise, d'une part, à déterminer dans quelles fractions intracellulaires le canal est séquestré par Klotho et d'autre part, à confirmer une colocalisation éventuelle du translocon et de TRPC6.

En effet, l'ouverture de TRPC6 est inhibée par l'anisomycine, l'antibiotique bloquant le translocon dans une conformation imperméable au Ca^{2+}. Il reste donc à déterminer si cette observation est due à un effet aspécifique de l'anisomycine sur l'activité TRPC6 ou s'il existe une coopération fonctionnelle entre le translocon et TRPC6. Celle-ci est aussi suggérée par l'augmentation de la réponse à la puromycine suite à une pré-stimulation des cellules avec l'OAG. Les outils pharmacologiques à notre disposition ne nous permettant pour l'instant pas de répondre à cette question, l'établissement de modèles génétiques semble indispensable.

En conclusion, la régulation de TRPC6 par Klotho ne semble pas suffisante pour la sensibilisation des cellules au stress du RE, mais du moins, elle participe à la fuite de Ca^{2+} réticulaire avec le translocon. L'évaluation de son importance dans l'état conformationnel du translocon et le stress du RE nécessite davantage d'investigations.

Enfin, l'implication d'un autre canal n'a pas été étudiée en détail au cours de ma thèse : l'inhibiteur spécifique de TRPC3 (Pyr3) montre que ce dernier est également présent dans des compartiments intracellulaires des cellules IB115-KL. Je n'ai pas su trouver dans la littérature d'autre exemple évoquant un rôle intracellulaire de TRPC3, ni aucune régulation de TRPC3 par Klotho. Il s'agit donc d'une toute nouvelle piste de recherche concernant le rôle de Klotho sur l'homéostasie calcique intracellulaire.

3) Mécanismes par lesquels Klotho régule la fuite calcique réticulaire par TRPC6 et le translocon

Le traitement des cellules IB115 avec KLs maintient TRPC6 dans des compartiments intracellulaires mais n'affecte pas l'ouverture du translocon. Ceci suggère que les mécanismes par lesquels Klotho agit sur l'un et l'autre ne sont pas forcément communs et renforce l'idée que la localisation de TRPC6 n'est peut-être pas identique dans les cellules IB115-KL et celles traitées avec la forme soluble.

- ***Régulation de TRPC6***

En revanche, le traitement des cellules IB115 avec l'inhibiteur d'IGF-1R (le BMS-754807) ou avec celui de MEK (PD98059) mime les effets de Klotho membranaire sur la

séquestration de TRPC6 et l'ouverture du translocon. Plusieurs mécanismes sont donc possibles pour l'inhibition de l'exocytose de TRPC6 :

- L'inhibition de l'exocytose par la PI3K, sans doute par l'interaction de Klotho avec les radeaux lipidiques [168]
- L'inhibition de la voie des MAPK, dépendante (et indépendante ?) d'IGF-1R
- Autre mécanisme inconnu : un effet intracellulaire sur le trafic de TRPC6 *via* son statut de glycosylation ? Un effet sur la production de ROS qui modifient l'activité du canal ?

Etant donné que KLs n'a pas d'effet sur l'ouverture du translocon, on peut exclure une inhibition significative des voies en aval d'IGF-1R, conformément aux résultats obtenus par western blot. Il est donc possible que son action se limite à la signalisation issue des radeaux lipidiques. En inhibant l'exocytose de TRPC6, KLs supprime la réponse calcique à IGF-1 sans forcément affecter le récepteur lui-même ou la voie des MAPK.

La forme membranaire de Klotho, quant à elle, empêche l'hyperactivation de ERK1/2 au cours de la stimulation avec IGF-1 ou au cours des traitements avec la TG ou la gemcitabine. Il n'est donc pas exclu qu'elle modifie la signalisation des radeaux lipidiques, mais son effet sur le translocon est aussi lié à l'inhibition de ERK1/2, qui entraîne la séquestration de TRPC6.

L'identité de l'intermédiaire est à confirmer mais il pourrait s'agir de STIM-1, puisqu'il régule l'hétérodimérisation et donc la localisation subcellulaire de TRPC6 [298]. De plus, il a été décrit que ERK1/2 phosphorylait STIM-1 au cours de la stimulation avec EGF [392]. On pourrait donc formuler l'hypothèse que la phosphorylation de STIM-1 par ERK1/2 stimule la translocation de TRPC6 à la membrane plasmique.

- ***Régulation du translocon***

En revanche, le mode d'action de Klotho sur le translocon est totalement inconnu. Aucune régulation par IGF-1, ERK, ou Klotho de la perméabilité au Ca^{2+} du translocon n'avait encore été décrite. Il s'agit donc d'un mécanisme inédit. La fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire par le translocon est responsable du phénotype chimiosensible des cellules IB115-KL.

IGF-1 étant connu pour favoriser la synthèse protéique, il se peut que l'atténuation de la voie dans les cellules IB115-KL ait un impact sur le turnover de la formation des complexes ribosome/translocon, ce qui pourrait modifier la proportion de translocons dans une conformation perméable au Ca^{2+}.

D'autre part, il est décrit que la voie induite par IGF-1 régule l'expression de BiP, la protéine chaperonne interagissant avec le translocon [189]. La signalisation d'IGF-1 pourrait donc aussi réguler BiP par des modifications post-traductionnelles, ou moduler d'autres protéines du complexe. L'atténuation de ces régulations dans les cellules IB115-KL favoriserait la fuite du Ca^{2+} réticulaire, le stress du RE et donc l'expression de BiP induite par ce stress. En effet, la surexpression de BiP semble être un mécanisme de compensation et donc une conséquence, plutôt qu'une cible directe de Klotho. Les MAPK pourraient également phosphoryler soit des protéines du translocon, soit un de leurs régulateurs, pour limiter la durée de fixation du ribosome une fois que le polypeptide est relâché dans le lumen du RE.

Enfin, les travaux d'Erdmann *et al* (2011) ont mis en évidence un mécanisme intéressant de l'ouverture du translocon : la fixation de la calmoduline liée au Ca^{2+} à la sous-unité Sec61α limite la fuite du Ca^{2+} réticulaire par le translocon [393]. En outre, la calmoduline peut non seulement réguler l'activité de TRPC6 en se fixant à son domaine C-terminal [394], mais sa phosphorylation par une src kinase stimule la translocation de TRPC6 à la membrane plasmique par la PI3K [395]. Une activité réduite de la calmoduline dans les cellules surexprimant *KL* pourrait dont faire le lien à la fois entre la fuite du Ca^{2+} par le translocon et la séquestration de TRPC6 dans les fractions intracellulaires. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que le Ca^{2+} et la calmoduline modulent la voie des MAPK [396].

Toutes ces pistes de réflexion sont à explorer dans le futur pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Car si le mécanisme de l'inhibition de TRPC6 par KLs est effectué par la signalisation des radeaux lipidiques, celui utilisé par la forme membranaire de Klotho régule également l'ouverture du translocon et implique l'atténuation de ERK1/2.

4) Mécanismes de l'inhibition de ERK1/2 par Klotho

La surexpression de Klotho n'a pas d'effet reproductible sur la phosphorylation basale de ERK1/2, mais elle empêche son hyperactivation lors de la stimulation avec IGF-1, tout comme le BMS-754807. La phosphorylation d'IGF-1R en Tyr1131 n'est pas inhibée par Klotho, mais la phosphorylation de deux autres résidus contribue à l'activation complète du récepteur et ils devront certainement être étudiés pour confirmer que Klotho n'agit pas sur le récepteur lui-même.

De plus, comme discuté dans l'article, les voies de l'UPR inactivent AKT mais favorisent la signalisation de ERK. Cette observation est cohérente avec d'autres études montrant que lors du stress réticulaire, l'inhibition d'AKT favorise l'activation de ERK, l'arrêt du cycle cellulaire et donc la survie [397]. La voie MEK/ERK permettrait également la séquestration de la caspase 4 par BiP [398] et augmenterait l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 [399].

Le rôle de ERK est d'ailleurs confirmé dans la survie des cellules IB115 au stress du RE. Or, malgré le stress du RE plus intense dans les cellules surexprimant *KL*, l'activation de ERK est tout de même plus faible. Ceci suggère que Klotho inhibe ERK par des voies supplémentaires à celle d'IGF-1.

Etant donné les nombreux mécanismes de compensation qui existent entre les récepteurs des facteurs de croissance, il est possible que Klotho inhibe d'autres RTK dans les cellules IB115. Certains FGFR étant amplifiés dans les sarcomes, il serait intéressant d'étudier l'impact de Klotho sur leur signalisation. D'autre part, il a été démontré dans les fibroblastes NIH3T3 que ERK participait aux signaux prolifératifs induits par Wnt3a [400]. La signalisation de Wnt étant aussi décrite comme étant un mécanisme de résistance à la gemcitabine, il est possible que Klotho l'inhibe dans les cellules IB115.

D'autre part, l'activité de ERK est également décrite comme modulée par le Ca^{2+} [401] et les ROS [402]. Il est possible que l'inhibition par Klotho des réponses calciques induite par IGF-1, et peut-être par d'autres facteurs de croissance, réduise son activation et son interaction avec certains partenaires pro-survie. Par ailleurs, Klotho inhibe la génération de ROS lors de l'ajout de TG sur les cellules. Il serait donc intéressant de confirmer que grâce à son pouvoir antioxydant, Klotho favorise les voies pro-apoptotiques du stress du RE, notamment en réduisant l'activation de ERK. A cela s'ajouterait dans le cas du traitement avec la gemcitabine une inhibition de la sénescence, qui reste à confirmer en répétant l'expérience, tout comme son rôle dans la survie des cellules IB115 à la chimiothérapie et l'impact de la signalisation MEK/ERK dans la mise en place de phénotype.

Enfin, la localisation intracellulaire de ERK est très importante quant aux conséquences de son activité. Une fois phosphorylée, elle peut interagir avec une importine, entrer dans le noyau et activer la transcription de gènes [403]. L'étude de sa translocation nucléaire au cours des traitements avec la TG ou la gemcitabine pourrait donc fournir des explications supplémentaires

concernant les mécanismes par lesquels Klotho re-sensibilise les cellules de DDLPS aux inducteurs du stress réticulaire.

5) Impact de la fuite réticulaire de Ca^{2+} induite par Klotho sur le métabolisme

Dans les cellules surexprimant *KL*, la fuite constitutive du Ca^{2+} et la préservation du contenu réticulaire indiquent que le Ca^{2+} doit être activement repompé par les SERCA afin d'éviter la déplétion des stocks calciques. Ceci suggère que les cellules IB115-KL consomment probablement plus d'ATP que les cellules contrôles.

L'efflux du Ca^{2+} réticulaire est absorbé par les mitochondries, dont le contenu en Ca^{2+} est plus élevé dans les cellules IB115-KL. L'hypothèse est donc la suivante : l'entrée du Ca^{2+} stimule le métabolisme mitochondrial et favorise la production d'ATP, qui est nécessaire à l'activité des pompes SERCA.

La rupture de l'un de ces mécanismes, comme l'inhibition de l'activité des SERCA par la TG, la perturbation des flux calciques entre le RE et les mitochondries par l'ABT-737, l'augmentation de la fuite de Ca^{2+} par le translocon par la gemcitabine ou encore la réduction de la production d'ATP, entraîne une déplétion du Ca^{2+} réticulaire plus intense dans les cellules surexprimant *KL* et donc un stress du RE.

La validation de ces hypothèses fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Fabien VAN COPPENOLLE (INSERM U1060, Lyon), afin d'étudier l'évolution du calcium réticulaire et mitochondrial ainsi que de l'ATP mitochondrial et cytosolique, à l'aide de senseurs protéiques fluorescents.

Discussion et perspectives sur le rôle des anti-apoptotiques dans la résistance des DDLPS à la gemcitabine

Le rôle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la chimiorésistance est déjà abondamment décrit dans la littérature scientifique, de même que le mode d'action de leurs inhibiteurs BH3-mimétiques. Ce projet est donc à visée translationnelle, afin de fournir les données pré-cliniques nécessaires à la mise en place de futurs essais cliniques sur les patients atteints de DDLPS qui, à l'heure actuelle, ne tirent pas de réel bénéfice à subir une chimiothérapie.

Avant de pouvoir ouvrir la voie à d'éventuels essais cliniques pour les patients atteints de DDLPS, l'expérimentation *in vivo* devra être refaite après de nouveaux pré-tests de toxicité permettant de déterminer la dose optimale tolérée par les souris. En effet, de nombreux travaux utilisent des doses bien plus importantes que celles que j'ai testées (jusqu'à 100mg/kg/j pendant 21j en combinaison [404]). Ensuite, les résultats sur les xénogreffes de cellules IB115 devront être confirmés sur une lignée n'exprimant pas ou peu Bcl-2. Dans ce sens, j'ai déjà fait des tests d'implantation et identifié la lignée IB143 comme pouvant prendre en greffe.

Par ailleurs, concernant le rôle de Mcl-1 vis-à-vis de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263, mes résultats suggèrent que cette protéine intervient de façon négligeable dans la résistance à la mort induite par ce traitement, dans la majorité des lignées testées. Plus surprenant, l'isoforme pro-apoptotique Mcl-1_S participe à la réponse apoptotique à la gemcitabine et son degré d'expression expliquerait le rôle sensibilisateur ou protecteur du A-1210477. Ces hypothèses sont en cours de validation par la comparaison en western blot de l'expression des deux isoformes de Mcl-1 dans les lignées IB111 et LPS80, après 48h de traitement avec la gemcitabine, avec ou sans ABT-263. Bien qu'à ma connaissance ce mécanisme n'ait encore jamais été décrit avec la gemcitabine, il a été montré dans les cellules Jurkat (leucémie aiguë lymphoblastique) que l'expression de Mcl-1_S est induite par un traitement avec le 5-Fluorouracil (5-FU) [405], un antimétabolite pyrimidique utilisé en chimiothérapie, comme la gemcitabine.

D'après l'ensemble de mes résultats, la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 présente un fort potentiel thérapeutique pour la prise en charge des DDLPS. Contrairement aux travaux effectués sur d'autre modèles de cancer, l'inhibition de Mcl-1, dans ce contexte, non

seulement ne semble pas apporter de bénéfice majeur dans la plupart des cas, mais peut même se révéler contre-productive dans le cas d'une expression non négligeable de Mcl-1_S.

Il y a dans le cas de ce travail un intérêt clinique fort puisque la gemcitabine (Gemzar) est déjà administrée aux patients atteints de liposarcomes et l'ABT-263 (Navitoclax, administré au patient par voie orale) a déjà été testé en essais cliniques de phase II. La toxicité de la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 a également été évaluée chez l'homme au cours d'un essai clinique de phase I sur des patients atteints de tumeurs solides [406].

Cet essai clinique a montré que la combinaison de ces molécules entraînait plusieurs effets secondaires : une thrombocytopénie (chute des plaquettes), une neutropénie (baisse du taux de polynucléaires neutrophiles), une anémie (baisse du taux de fer dans le sang), une élévation des enzymes hépatiques, des nausées, des diarrhées et des vomissements. Ces effets secondaires sont pour la plupart communs au navitoclax et à la gemcitabine. De plus, la thrombocytopénie n'est que transitoire, les taux redevenant normaux la semaine suivant le traitement. En conclusion, les auteurs estiment que la combinaison a un profil de tolérance favorable.

En revanche, le traitement n'a pas eu d'effet notable sur la survie sans progression (1,6 mois), et aucune réponse partielle ou complète n'a été observée. Cette cohorte de patients rassemble cependant de nombreux types de tumeurs très différents. Dans ce contexte, il est impossible de discerner si un modèle de cancer en particulier présente une sensibilité particulière à la combinaison. De plus, 89% des patients ont déjà subi au moins trois traitements chimiothérapeutiques auparavant, et 23.9% ont déjà reçu un traitement à base de gemcitabine. On peut donc penser que dans cette cohorte, la majorité des patients présente des tumeurs particulièrement chimiorésistantes et pour le quart d'entre eux environ, les cellules tumorales résistantes à la gemcitabine ont été sélectionnées au cours des traitements précédents.

Il serait donc intéressant à l'avenir de tester l'efficacité clinique de la combinaison sur une cohorte de patients de sarcomes des tissus mous, et plus spécifiquement sur des patients atteints de DDLPS. En effet, toutes les lignées que j'ai pu tester ont répondu fortement au traitement, contrairement à une lignée de sarcome indifférencié (MFH-137) pour laquelle l'ajout d'ABT-263 n'a pas eu d'effet sur la mort cellulaire induite par la gemcitabine (**Figure 89**). Ceci suggère une sensibilité spécifique des DDLPS à la combinaison, par rapport à d'autres sarcomes.

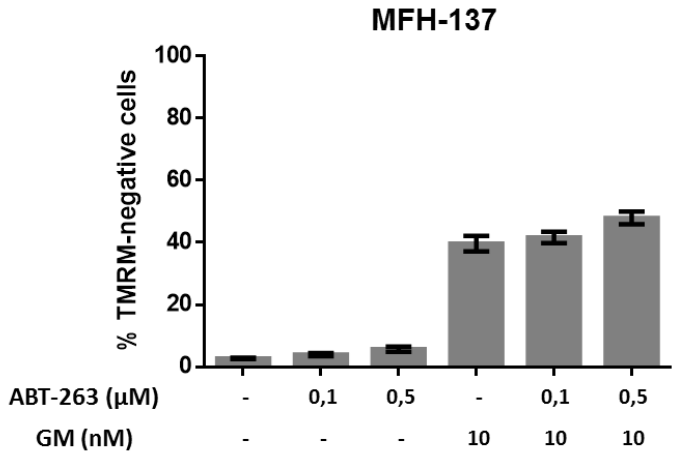


Figure 89 *L'ABT-263 n'a pas d'effet notable sur la sensibilité d'une lignée de sarcome indifférencié à la gemcitabine*

Par ailleurs, des travaux récents ont montré que l'ABT-737 sensibilise *in vitro* des lignées de léiomyosarcomes à la doxorubicine. Le bénéfice des BH3-mimétiques n'est peut-être donc pas limité à la combinaison avec la gemcitabine, ni au sous-type histologique des DDLPS. Il conviendra donc de comparer les sous-types histologiques entre eux, de même que les molécules testées en combinaison. Un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour tester l'efficacité de la combinaison de l'ABT-263 et du docetaxel (Taxotere), une autre chimiothérapie utilisée pour traiter les sarcomes, sur des patients atteints de tumeurs solides (NCT00888108). L'ABT-263 suscite également de l'intérêt avec les thérapies ciblées : un essai clinique de phase I est en cours de recrutement pour le tester en combinaison avec le trametinib, un inhibiteur de MEK, sur des patients avec des tumeurs solides avancées ou métastatiques, principalement du poumon, du pancréas et du colon (NCT02079740). Cette combinaison pourrait se révéler intéressante pour les DDLPS, en particulier dans le cas où nos résultats sur l'inhibition de MEK et le stress calcique du RE se confirmaient dans d'autres lignées puis *in vivo*.

Enfin, étant donné que Klotho sensibilise les cellules IB115 à la gemcitabine d'une part, et aux ABT-737/263 d'autre part, j'ai comparé la réponse apoptotique à la combinaison des deux dans les lignées IB115 exprimant le vecteur contrôle ou *KL* (**Figure 90**).

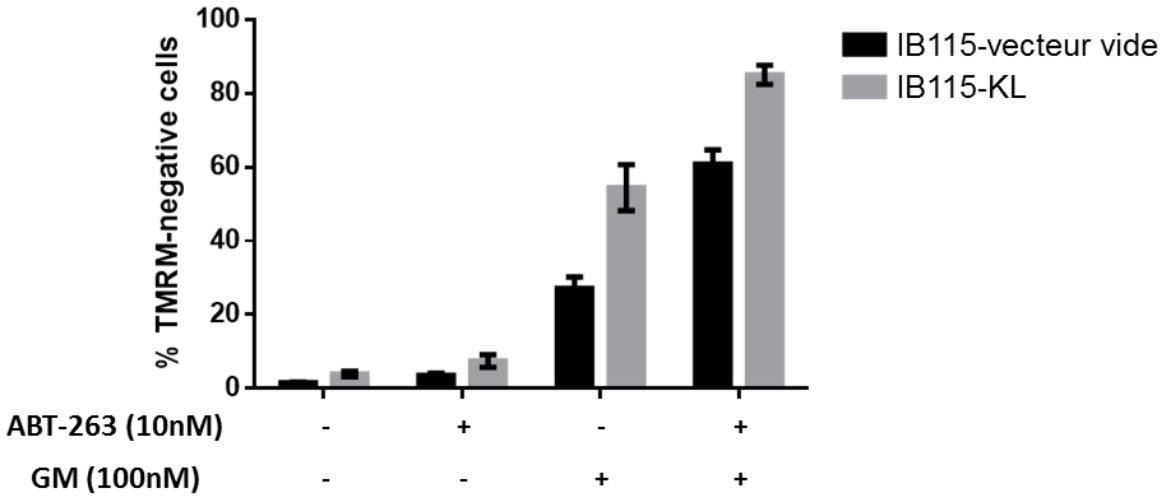


Figure 90 *La surexpression de KL potentialise la réponse apoptotique de la lignée IB115 à la combinaison de la gemcitabine et de l'ABT-263 à faible dose*

Il s'avère que Klotho sensibilise les cellules à une très faible dose d'ABT-263 (10nM). Ce résultat est représentatif de plusieurs expériences indépendantes.

Il apparaît donc nécessaire de confirmer cette observation dans d'autres lignées cellulaires afin de pouvoir proposer cette approche thérapeutique complémentaire dans le traitement des DDLPS. Si son efficacité se confirme, le repositionnement de molécules augmentant l'expression de *KL* combiné à la gemcitabine et à l'ABT-263 permettra peut-être d'augmenter l'action antitumorale du traitement, tout en réduisant les doses utilisées afin de limiter les effets secondaires qui affaiblissent le patient et participent à la dégradation de sa santé et de sa qualité de vie. La combinaison pourrait également être envisagée avec le BMS-754807 ou le trametinib, puisque l'inhibition d'IGF-1R ou MEK mime les effets de Klotho sur l'ouverture du translocon (Figure 91).

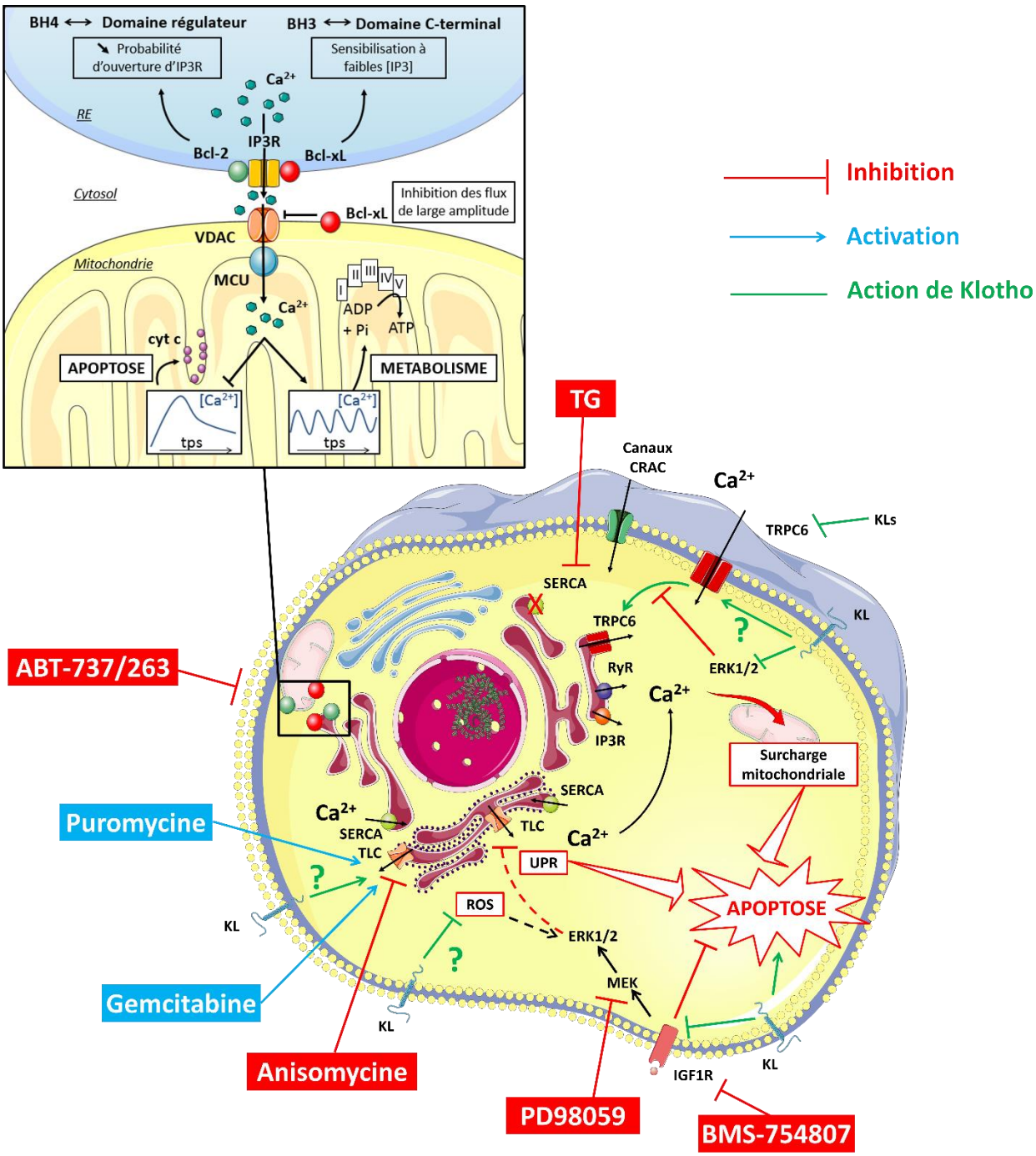


Figure 91 *Schéma-bilan de l'action de Klotho dans la cellule de DDLPS et de l'action des principaux outils pharmacologiques utilisés*

DISCUSSION GENERALE

La signalisation calcique, Klotho et les liposarcomes : une connexion par la différenciation cellulaire ?

L'impact du Ca^{2+} sur l'initiation ou la progression des liposarcomes est inconnu. Toutefois, un cas clinique intéressant a été rapporté dans la littérature [407]: un patient atteint de glomérulosclérose focale, associée à une protéinurie puis une insuffisance rénale chronique, a développé dans l'abdomen une masse importante avec des calcifications. L'analyse post-opératoire a montré qu'il s'agissait d'un liposarcome avec des composantes bien différenciées, dédifférenciées et myxoïdes, ainsi qu'une importante métaplasie osseuse. Il ne s'agit pas du seul cas clinique décrivant le développement d'un liposarcome associé à une glomérulosclérose [408]. Le premier patient présentant une hyperphosphatémie et une hypocalcémie [407], l'existence d'un lien éventuel entre ce contexte physiologique et la survenue d'un cancer aussi rare que le liposarcome est une question qui mérite d'être posée. La phosphatémie et la calcémie étant régulées par Klotho, il est probable que son expression soit réduite chez ce patient, comme dans la plupart des cas d'insuffisance rénale. Il aurait été intéressant de le confirmer, mais cela n'a pas été fait dans cette étude. Ces observations cliniques interrogent quant à l'impact possible de la phosphatémie, de la calcémie et de Klotho sur le développement de liposarcomes.

Cette éventualité est d'autant plus d'autant plus crédible que les hommes ayant une calcémie élevée, mais dans les normes, ont un risque accru de développer un cancer prostatique fatal, équivalent à celui associé aux antécédents familiaux [409]. Le risque est triplé si l'on ne prend en compte que le calcium ionisé plasmatique, c'est-à-dire la forme libre [410]. Les auteurs proposent donc qu'une calcémie dans la norme haute soit un biomarqueur de prédictif d'un cancer de la prostate.

Toutefois, si le rôle de la calcémie sur l'oncogenèse des liposarcomes est inconnu, quelques études montrent que certains régulateurs de l'homéostasie calcique intracellulaire sont surexprimés et impliqués dans l'agressivité des cellules : la calréticuline [337] et la SERCA2 [335,336]. Une forte expression de la SERCA2 est par ailleurs associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de liposarcomes.

L'expression de la calréticuline, comme la SERCA2, favorise la dédifférenciation des cellules de liposarcomes. Les mécanismes concernant la calréticuline ne sont pas connus mais une forte expression de la SERCA2b dans une lignée de LPS entraîne une accumulation de

ROS, associées à l'activation de ERK *in vitro* [336]. ERK va alors inactiver, par phosphorylation, le régulateur de la différenciation adipogénique PPARγ. Les auteurs analysent également par immunohistochimie l'abondance des formes phosphorylées de ERK et PPARγ dans les tumeurs de LPS. La phosphorylation de PPARγ n'est pas détectée dans les tumeurs bien différenciées, en revanche son marquage est fort dans les tumeurs plus agressives (liposarcome pléomorphe, dédifférencié, à cellules rondes). Parmi ces tumeurs positives, pour 9/12 d'entre elles, un fort marquage de la forme phosphorylée de ERK est associé.

Etant donné son effet sur la signalisation calcique, les ROS et sur la voie des MAPK, il semble incontournable d'étudier l'effet de Klotho sur la phosphorylation de PPARγ et la différenciation des cellules de liposarcomes. Cet aspect est d'autant plus important que l'induction de PPARγ fait partie des thérapies ciblées toujours en cours de développement qui, avec les précédents agonistes de PPARγ, n'avaient pas démontré d'efficacité suffisante.

En outre, Klotho est impliquée dans différentes étapes de l'adipogenèse [205,206] et essentielle à l'homéostasie du tissu adipeux : chez les souris $kl^{-/-}$, l'atrophie de la peau est principalement due à l'absence quasi-totale de tissu adipeux blanc [79]. Son expression est significativement réduite dans les tumeurs de DDLPS par rapport au tissu adipeux sain.

A ma connaissance, bien que la signalisation calcique intracellulaire aussi soit impliquée au cours de l'adipogenèse [411], ses effecteurs demeurent inconnus et son lien éventuel avec Klotho n'a jamais été étudié.

La fuite réticulaire par le translocon, allant contre l'activité des SERCA, pourrait être impliquée dans ce processus. D'autre part, l'ARNm de TRPC6 est détecté dans les cellules souches et les précurseurs, mais pas dans les adipocytes matures [288]. Ceci suggère que l'expression de TRPC6 dans les DDLPS pourrait participer au phénotype dédifférencié. Bien que Klotho ne semble pas réduire son expression, il sera donc intéressant de regarder si la localisation et l'activité de TRPC6 ont un impact sur le potentiel de différenciation des cellules de DDLPS. Enfin, le rôle de Klotho sur l'homéostasie calcique d'adipocytes et de cellules souches mésenchymateuses saines mérite d'être étudié afin de le comparer à celui observé dans le cas des DDLPS.

Mais si l'homéostasie calcique réticulaire semble être impliquée dans la différenciation des liposarcomes, sa modulation à visée thérapeutique principale demeure l'induction du stress réticulaire.

Les stress du RE comme cible thérapeutique dans les liposarcomes

Le réticulum endoplasmique est la réserve majeure de Ca^{2+} de la cellule et le principal lieu de maturation des protéines. Il entretient un dialogue étroit avec les mitochondries pour répondre aux divers stress que subit la cellule. Sous l'effet de l'activation aberrante des oncogènes et du remodelage de la signalisation calcique, les cellules cancéreuses présentent un stress réticulaire basal qui favorise leur survie. Mais ceci implique qu'elles sont plus sensibles que les cellules saines à la perturbation de cet équilibre. Dans les cellules de DDLPS surexprimant *KL*, on ne constate pas d'augmentation de la mort cellulaire basale, en revanche leur réponse apoptotique aux inducteurs de stress réticulaire est potentialisée. Sachant que les DDLPS sont des tumeurs particulièrement résistantes au traitement, chimiothérapeutiques ou ciblés, altérer la protéostasie et l'intégrité des mitochondries par l'intermédiaire du stress calcique du RE est une stratégie thérapeutique séduisante.

Comme le montrent mes résultats, le ciblage des SERCA présente un grand intérêt en association avec des chimiothérapies comme la gemcitabine, qui induit le stress du RE au moins en partie en ouvrant le translocon. Cette approche pourrait bientôt se concrétiser en clinique, car un dérivé de la TG a été développé. Il s'agit de l'ASP-8ADT, dont le nom à l'état de prodrogue est le G-202® et le générique est mipsagargine. Dans l'organisme, le G-202® est activé par la PSMA (P*rostate-Specific Membrane Antigen*) [412], exprimée par la plupart des tumeurs solides dont certains sarcomes de haut grade [413]. Cette molécule est en essai clinique de phase II pour les patients atteints de glioblastome récurrent ou progressif (NCT02067156), de carcinome rénal à cellules claires (NCT02607553) et de cancer prostatique (NCT02381236).

Par ailleurs, la combinaison de l'ABT-263 (navitoclax) et de la gemcitabine a fait preuve d'une grande efficacité quant à l'induction de la mort des cellules de DDLPS *in vitro*, sur toutes les lignées testées. Ce résultat est cohérent avec le mécanisme d'action de *KL* sur la mort induite par la gemcitabine dans les DDLPS puisque les protéines anti-apoptotiques Bcl- et Bcl-xL sont à l'interface entre l'homéostasie calcique, le stress réticulaire, le métabolisme mitochondrial et l'apoptose.

Le traitement étant bien toléré par les souris, les tests *in vivo* seront reproduits avec des dosages plus importants afin de démontrer son action antitumorale. Il pourra être envisagé, lorsque le protocole d'administration de la combinaison thérapeutique sera mis au point, de tester son effet sur des modèles PDX (*Patient-Derived Xenografts*), qui consistent en des greffes séquentielles de tumeurs de patient sur des souris. Ce modèle permet de mieux préserver les

caractéristiques de la tumeur d'origine. Des modèles PDX ont déjà été établis à partir de STM, parmi lesquels des DDLPS [414].

A ces combinaisons thérapeutiques pourrait s'ajouter le repositionnement de médicaments connus pour stimuler l'expression de *KL* (le losartan, dont le nom du médicament est Cozaar, qui inhibe l'angiotensine II ou encore les glitazones, agonistes de PPARγ), puisque la présence des formes solubles dans le milieu extracellulaire ne semble pas sensibiliser au stress réticulaire.

Le remodelage de l'homéostasie calcique par Klotho lui confère à la fois un rôle important dans l'induction des voies intracellulaires de l'apoptose, mais pourrait également l'impliquer dans la mort immunogénique. En effet, le stress réticulaire entraîne la translocation des protéines chaperonnes, Bip et la calréticuline, à la surface de la cellule. Ceci constitue un système de reconnaissance par le système immunitaire qui permet la destruction de la cellule tumorale. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'une forte expression de *KL* sur la réponse du système immunitaire lors du traitement des tumeurs, avec la gemcitabine par exemple. Cet effet possible de Klotho n'a encore jamais été étudié, car les études de son rôle suppresseur de tumeur *in vivo* impliquait des xénogreffes de lignées humaines sur des souris immunodéficientes. Etant donné les connaissances actuelles sur le rôle majeur des infiltrats tumoraux sur la progression tumorale et le potentiel de l'immunothérapie dans la lutte contre le cancer, l'action de Klotho sur le microenvironnement devra être examinée.

Quel rôle pour la protéine de longévité dans le microenvironnement tumoral ?

Au cours de mon projet de thèse, j'ai pu montrer que la perte de l'expression de *KL* procure un avantage sélectif pour les cellules de liposarcomes. En effet, Klotho inhibe la prolifération, la clonogénicité, sensibilise au stress réticulaire et réduit l'activation de ERK. Une forte expression de *KL* est d'ailleurs associée à une meilleure survie des patients. En revanche, aucune donnée de la littérature ne démontre de lien de cause à effet entre l'altération de l'expression de *KL* et l'initiation de l'oncogenèse.

Cependant, les patients atteints du syndrome de Laron amènent à émettre l'hypothèse d'une protection possible par Klotho vis-à-vis des cancers, *via* l'inhibition de la voie insuline/IGF-1. En effet, il s'agit d'une de ses principales actions dans l'augmentation de l'espérance de vie [171]. Les modèles animaux ont également montré que l'atténuation de cette voie réduisait le développement de cancers. En l'occurrence, étant donné l'importance de la

voie insuline/IGF-1 dans l'homéostasie du tissu adipeux, il se peut que l'absence ou la réduction de l'expression de *KL* contribue au développement de liposarcomes. Dans les cas cliniques évoqués plus haut de liposarcomes, la glomérulosclérose pourrait être un signe de l'altération importante de l'expression de *KL* dans l'organisme, le rein étant l'organe l'exprimant le plus.

Il est fortement probable que la diminution de son expression avec l'âge participe à la mise en place d'un microenvironnement favorable à l'initiation et la progression tumorales. En effet, en inhibant la sénescence, elle réduit la sécrétion des facteurs du SASP qui peuvent contribuer à la croissance tumorale et encouragent l'inflammation. L'inflammation est d'ailleurs un facteur important dans les maladies dégénératives et hyperplasiques. Le rôle de Klotho dans l'inflammation associée au cancer n'a pas encore été étudié, mais étant donné son action sur le système immunitaire et les voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires, cette problématique mérite d'être abordée. Enfin, la production modérée de ROS participe au développement tumoral et l'effet antioxydant de Klotho pourrait contribuer à limiter la peroxydation des lipides, protéines et à protéger les mitochondries afin de limiter les stress qui contribuent à la néoplasie. Bien que la plupart des études se soient focalisées sur les voies IGF-1 et Wnt, ses propriétés anti-vieillissement jouent certainement un rôle central dans son action suppresseur de tumeur.

Les cellules du microenvironnement subissent un remodelage, du métabolisme ou de la signalisation calcique par exemple, sous l'influence des cellules tumorales. Elles contribuent également, par exemple en libérant de l'IGF-1 dans le milieu, à la chimiorésistance des tumeurs[415]. La sécrétion de KLs dans le milieu par des fibroblastes a un « effet suppresseur de tumeur » sur des sphéroïdes de mélanomes en inhibant la voie de Wnt [263]. Son potentiel « suppresseur de tumeur » pourrait donc ne pas être lié uniquement à son action directe sur les cellules tumorales, mais aussi à l'inhibition qu'elle exerce sur les voies de signalisation des facteurs de croissance, sécrétés par les cellules du microenvironnement. La régulation de la migration, de la prolifération, de l'activation des voies dépendant des facteurs de croissance pourrait également être due à son activité sialidase. En effet les motifs de glycosylation à la surface des cellules sont profondément altérés dans les cancers et participent à la croissance tumorale, à l'inflammation et à la réponse immunitaire [416,417]. Le rôle éventuel de Klotho vis-à-vis des chaînes des glycanes à la surface des cellules cancéreuses constitue donc une piste de recherche supplémentaire quant à son rôle « suppresseur de tumeur ».

Le remodelage de la signalisation calcique dans la cellule tumorale : un phénomène complexe à décrypter pour avancer dans la lutte contre le cancer

Au cours de ma thèse, j'ai pu observer un mécanisme de sensibilisation par Klotho à des inducteurs du stress du RE reposant sur la signalisation calcique. Cette action de Klotho comprend l'augmentation de la fuite constitutive du Ca^{2+} réticulaire, de l'entrée capacitive et la réduction de l'influx de Ca^{2+} par TRPC6 à la membrane plasmique. Le remodelage de l'homéostasie calcique intracellulaire par Klotho contribue donc à son rôle « suppresseur de tumeur » et offre un exemple de plus de l'importance du Ca^{2+} dans la réponse au traitement.

Bien que le remodelage de la signalisation calcique soit fréquemment considéré comme une conséquence de la transformation maligne, il est à noter que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire est un élément commun de réponse aux stimuli oncogéniques. Il serait donc intéressant d'aborder le rôle du Ca^{2+} non pas dans la progression tumorale, mais dans la transformation oncogénique.

La nature du remodelage de l'homéostasie calcique dans la cellule tumorale dépend à la fois du type de cancer étudié, de son degré de malignité, du contexte physiologique dans lequel la tumeur évolue, etc… Elle ne peut donc pas être abordée uniquement en fonction de l'altération récurrente de certains acteurs, mais plutôt comme un ensemble d'adaptations aux pressions de sélection qui vont favoriser certains profils de développement tumoral (agressivité locale, dissémination métastatique, etc…). L'étude des signatures calciques, c'est-à-dire le codage en amplitude, dans l'espace et dans le temps des signaux calciques, doit donc primer sur l'étude isolée de canaux, car elle permettra certainement de mieux mettre en évidence les voies de la signalisation calcique communément altérées dans la cellule cancéreuse.

La difficulté majeure à laquelle les chercheurs doivent faire face lorsqu'ils étudient le remodelage de la signalisation calcique est que, certes, certaines altérations telles que la modification de l'expression de certains acteurs peuvent être appréhendées par des techniques de haut débit comme les puces d'expression, mais cependant, beaucoup sont de l'ordre du fonctionnel et non du transcriptionnel. Ainsi, tant qu'il n'existera pas d'approche globale concernant l'analyse :

- de l'activité des canaux,
- de leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, etc…),
- de la nature des complexes impliqués (les sous-unités TRP, par exemple, s'hétéromérisent et cela modifie les propriétés du canal),

- de la localisation des canaux calciques et de leurs régulateurs,

la compréhension des mécanismes en jeu dans la cellule restera partielle et très dépendante des conditions d'expérimentation et du type cellulaire étudié.
Une vue d'ensemble plus exhaustive permettra peut-être à l'avenir d'identifier des nœuds communs aux phénotypes cellulaires et à différents types tumoraux, qui pourront faire l'objet d'un ciblage thérapeutique épargnant les cellules saines du reste de l'organisme.

Mais pouvoir prédire les signatures calciques générées, et donc leurs conséquences sur le phénotype des cellules tumorales, sous-entend un degré de complexité élevé qui nécessite l'élaboration de modèles mathématiques intégrant toutes ces informations. Ce type d'approche est déjà en cours de développement, par exemple pour appréhender l'impact de l'hôte sur la croissance tumorale [418], modéliser l'évolution métastatique [419], la survie des patients en fonction du développement de résistance à certains traitements [420], ou encore pour modéliser la synergie et améliorer l'efficacité de la combinaison de certains traitements [421,422]. Il est certain que l'intégration des résultats expérimentaux dans des modèles mathématiques pour prédire l'effet de certaines drogues sur l'homéostasie calcique, par exemple, permettra d'orienter le développement clinique de molécules ciblant les régulateurs aux nœuds des voies communément altérées, afin de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements. Les modèles prédictifs pourraient également permettre d'anticiper leurs effets secondaires.

Tous ces développements sont accompagnés par les progrès de l'informatique et notamment le *machine learning,* qui permet grâce à des algorithmes informatiques d'apprendre à partir d'un nombre immense de données hétérogènes. Le *machine learning* est déjà utilisé pour l'analyse d'images, des données de séquençage, la prédiction de structures 3D [423] mais également pour prédire, par exemple, le nombre de métastases cérébrales ré-apparaissant par année après un traitement et donc la survie de ces patients [424].

L'intégration des modèles mathématiques et des progrès informatiques dans les projets de biologie permettra certainement à l'avenir de réaliser un grand pas dans la compréhension du processus oncogénique et donc d'avancer dans la lutte contre le cancer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jo, V. Y. & Fletcher, C. D. M. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology (Phila.)* **46,** 95–104 (2014).

2. Clark, M. A., Fisher, C., Judson, I. & Thomas, J. M. Soft-tissue sarcomas in adults. N. *Engl J Med* **353,** 701–711 (2005).

3. Stiller, C. A. & Parkin, D. M. International variations in the incidence of childhood soft-tissue sarcomas. *Paediatr Perinat Epidemiol* **8,** 107–119 (1994).

4. Rubino, C. Radiation dose and risk of soft tissue and bone sarcoma after breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat* **89,** 277–288 (2005).

5. Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L. & Schiffman, J. D. The Epidemiology of Sarcoma. *Clin. Sarcoma Res.* **2,** 14 (2012).

6. Coggon, D., Ntani, G., Harris, E. C., Jayakody, N. & Palmer, K. T. SOFT TISSUE SARCOMA, NON-HODGKIN LYMPHOMA AND CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA IN WORKERS EXPOSED TO PHENOXY HERBICIDES: EXTENDED FOLLOW-UP OF A UK COHORT. *Occup. Environ. Med.* **72,** 435–441 (2015).

7. Kedes, D. H. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med* **2,** 918–924 (1996).

8. DE Marchis, M. L. *et al.* Desmoid Tumors in Familial Adenomatous Polyposis. *Anticancer Res.* **37,** 3357–3366 (2017).

9. Ducimetière, F. *et al.* Incidence of Sarcoma Histotypes and Molecular Subtypes in a Prospective Epidemiological Study with Central Pathology Review and Molecular Testing. *PLoS ONE* **6,** e20294 (2011).

10. Chibon, F. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med* **16,** 781–787 (2010).

11. Lartigue, L. *et al.* Genomic index predicts clinical outcome of intermediate-risk gastrointestinal stromal tumours, providing a new inclusion criterion for imatinib adjuvant therapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **51,** 75–83 (2015).

12. Chibon, F. A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* **139,** 24–29 (2002).

13. Knebel, C. *et al.* Prognostic factors and outcome of Liposarcoma patients: a retrospective evaluation over 15 years. *BMC Cancer* **17,** (2017).

14. Peterson, J. J., Kransdorf, M. J., Bancroft, L. W. & O'Connor, M. I. Malignant fatty tumors: classification, clinical course, imaging appearance and treatment. *Skeletal Radiol.* **32,** 493–503 (2003).

15. Mandahl, N. *et al.* Scattered genomic amplification in dedifferentiated liposarcoma. *Mol. Cytogenet.* **10,** (2017).

16. Henricks, W. H., Chu, Y. C., Goldblum, J. R. & Weiss, S. W. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* **21,** 271–281 (1997).

17. Tirumani, S. H. *et al.* Metastasis in dedifferentiated liposarcoma: Predictors and outcome in 148 patients. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **41,** 899–904 (2015).

18. Chibon, F. & Aurias, A. Biologie moléculaire des sarcomes des tissus mous. *Oncologie* **9,** 88–96 (2007).

19. Sandberg, A. A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **155,** 1–24 (2004).

20. Antonescu, C. R. *et al.* Specificity of TLS-CHOP rearrangement for classic myxoid/round cell liposarcoma: absence in predominantly myxoid well-differentiated liposarcomas. *J. Mol. Diagn. JMD* **2,** 132–138 (2000).

21. Pérez-Losada, J. *et al.* Liposarcoma initiated by FUS/TLS-CHOP: the FUS/TLS domain plays a critical role in the pathogenesis of liposarcoma. *Oncogene* **19,** 6015–6022 (2000).

22. Antonescu, C. R. *et al.* Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7,** 3977–3987 (2001).

23. Chibon, F. *et al.* A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* **139,** 24–29 (2002).

24. Gebhard, S. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Am J Surg Pathol* **26,** 601–616 (2002).

25. Dalal, K. M., Kattan, M. W., Antonescu, C. R., Brennan, M. F. & Singer, S. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann. Surg.* **244,** 381–391 (2006).

26. Matthyssens, L. E., Creytens, D. & Ceelen, W. P. Retroperitoneal Liposarcoma: Current Insights in Diagnosis and Treatment. *Front. Surg.* **2,** (2015).

27. O'Sullivan, B. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet Lond Engl* **359,** 2235–2241 (2002).

28. Italiano, A. *et al.* Advanced well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23,** 1601–1607 (2012).

29. Crago, A. M. & Singer, S. Clinical and Molecular Approaches to Well-differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma. *Curr. Opin. Oncol.* **23,** 373–378 (2011).

30. Ryan, C. W. & Desai, J. The past, present, and future of cytotoxic chemotherapy and pathway-directed targeted agents for soft tissue sarcoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.* (2013). doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.e386

31. Dufresne, A. [Molecular biology of sarcoma and therapeutic choices]. *Bull Cancer Paris* **102,** 6–16 (2015).

32. Casali, P. G. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol J Eur Soc Med Oncol* **20,** 64–67 (2009).

33. Emile, J. F. *et al.* Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the MolecGIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs. *Med. Oncol.* **29,** 1765–1772 (2012).

34. van der Graaf, W. T. A. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Lond. *Engl* **379,** 1879–1886 (2012).

35. Rodriguez-Antona, C. & Ingelman-Sundberg, M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* **25,** 1679–1691 (2006).

36. Hochwald, S. N., Rose, D. M., Brennan, M. F. & Burt, M. E. Elevation of glutathione and related enzyme activities in high-grade and metastatic extremity soft tissue sarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* **4,** 303–309 (1997).

37. Zhuo, R. *et al.* Targeting Glutathione S-transferase M4 in Ewing sarcoma. *Front. Pediatr.* **2,** 83 (2014).

38. Cummings, J. *et al.* Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem. Pharmacol.* **67,** 31–39 (2004).

39. Nakanishi, H., Myoui, A., Ochi, T. & Aozasa, K. P-glycoprotein expression in soft-tissue sarcomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123,** 352–356 (1997).

40. Oda, Y. *et al.* ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human soft tissue sarcomas. *Int. J. Cancer* **114,** 854–862 (2005).

41. Abolhoda, A. *et al.* Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5,** 3352–3356 (1999).

42. Komdeur, R. *et al.* Expression of multidrug resistance proteins, P-gp, MRP1 and LRP, in soft tissue sarcomas analysed according to their histological type and grade. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **39,** 909–916 (2003).

43. Katayama, K., Yoshioka, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J. & Sugimoto, Y. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Mol. Cancer Ther.* **6,** 2092–2102 (2007).

44. Lima, M. *et al.* Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. *Oncotarget* **7,** 25885–25901 (2016).

45. Natarajan, S., Hombach-Klonisch, S., Dröge, P. & Klonisch, T. HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells. *Neoplasia N. Y. N* **15,** 263–280 (2013).

46. Italiano, A. *et al.* HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int. J. Cancer* **122,** 2233–2241 (2008).

47. Kappler, M. *et al.* Elevated Expression Level of Survivin Protein in Soft-Tissue Sarcomas Is a Strong Independent Predictor of Survival. *Clin. Cancer Res.* **9,** 1098–1104 (2003).

48. de Graaff, M. A. *et al.* High-Throughput Screening of Myxoid Liposarcoma Cell Lines: Survivin Is Essential for Tumor Growth. *Transl. Oncol.* **10,** 546–554 (2017).

49. Gobble, R. M. *et al.* Expression profiling of liposarcoma yields a multigene predictor of patient outcome and identifies genes that contribute to liposarcomagenesis. *Cancer Res.* **71,** 2697–2705 (2011).

50. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 455–465 (2013).

51. Erler, J. T. *et al.* Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. *Mol. Cell. Biol.* **24,** 2875–2889 (2004).

52. Köhler, T. *et al.* High bad and bcl-xL gene expression and combined bad, bcl-xL, bax and bcl-2 mRNA levels: molecular predictors for survival of stage 2 soft tissue sarcoma patients. *Anticancer Res.* **22,** 1553–1559 (2002).

53. Kirkin, V., Joos, S. & Zörnig, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1644,** 229–249 (2004).

54. de Graaff, M. A. *et al.* Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br. J. Cancer* **114,** 1219–1226 (2016).

55. LaPensee, E. W., Reddy, S. P., Hugo, E. R., Schwemberger, S. J. & Ben-Jonathan, N. LS14 cells: a model for chemoresistance in liposarcoma. *Cancer Biol. Ther.* **6,** 519–524 (2007).

56. Delbridge, A. R. D., Grabow, S., Strasser, A. & Vaux, D. L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **16,** 99–109 (2016).

57. Reynoso, D. *et al.* Synergistic induction of apoptosis by the Bcl-2 inhibitor ABT-737 and imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumor cells. *Mol. Oncol.* **5,** 93–104 (2011).

58. Vincent, A. M. & Feldman, E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc.* **12,** 193–197 (2002).

59. Lin, F. *et al.* Evaluation of the Expression and Role of IGF Pathway Biomarkers in Human Sarcomas. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **26,** 169–177 (2013).

60. Liang, J., Li, B., Yuan, L. & Ye, Z. Prognostic value of IGF-1R expression in bone and soft tissue sarcomas: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* **8,** 1949–1955 (2015).

61. Conti, A. *et al.* Mapping protein signal pathway interaction in sarcoma bone metastasis: linkage between rank, metalloproteinases turnover and growth factor signaling pathways. *Clin. Exp. Metastasis* **31,** 15–24 (2014).

62. Tomita, Y. *et al.* Prognostic Significance of Activated AKT Expression in Soft-Tissue Sarcoma. *Clin. Cancer Res.* **12,** 3070–3077 (2006).

63. Tricoli, J. V. *et al.* Enhanced Levels of Insulin-like Growth Factor Messenger RNA in Human Colon Carcinomas and Liposarcomas. *Cancer Res.* **46,** 6169–6173 (1986).

64. Peng, T. *et al.* An experimental model for the study of well differentiated and dedifferentiated liposarcoma; deregulation of targetable tyrosine kinase receptors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **91,** 392–403 (2011).

65. Kanojia, D. *et al.* Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* **6,** 42429–42444 (2015).

66. Benassi, M. S. *et al.* Tissue and serum IGFBP7 protein as biomarker in high-grade soft tissue sarcoma. *Am. J. Cancer Res.* **5,** 3446–3454 (2015).

67. King, H., Aleksic, T., Haluska, P. & Macaulay, V. M. Can we unlock the potential of IGF-1R inhibition in cancer therapy? *Cancer Treat. Rev.* **40,** 1096–1105 (2014).

68. Wachtel, M. *et al.* FGFR4 signaling couples to Bim and not Bmf to discriminate subsets of alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Cancer* **135,** 1543–1552 (2014).

69. Zeng, X., Zhang, H., Oh, A., Zhang, Y. & Yee, D. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity of human cancer cells by tyrosine kinase inhibition of insulin receptor and type I IGF receptor. *Breast Cancer Res. Treat.* **133,** 117–126 (2012).

70. Zeng, X., Sachdev, D., Zhang, H., Gaillard-Kelly, M. & Yee, D. Sequencing of type I insulin-like growth factor receptor inhibition affects chemotherapy response in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15,** 2840–2849 (2009).

71. Miller, M. L. *et al.* Drug synergy screen and network modeling in dedifferentiated liposarcoma identifies CDK4 and IGF1R as synergistic drug targets. *Sci. Signal.* **6,** ra85 (2013).

72. Vassilev, L. T. Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle Georget. Tex* **3,** 419–421 (2004).

73. Morris, D. G. *et al.* A Phase II Study of Flavopiridol in Patients With Previously Untreated Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma* **2006,** 64374 (2006).

74. Kao, J. *et al.* Phase 1 study of concurrent sunitinib and image-guided radiotherapy followed by maintenance sunitinib for patients with oligometastases: acute toxicity and preliminary response. *Cancer* **115,** 3571–3580 (2009).

75. Porzio, R., Bella, M. A., Rossi, G. & Ardizzoni, A. Long-lasting clinical benefit of sunitinib malate in the treatment of a case of heavily pre-treated metastatic liposarcoma. *Anticancer Res.* **33,** 1061–1063 (2013).

76. Ranieri, G. *et al.* Pazopanib a tyrosine kinase inhibitor with strong anti-angiogenetic activity: a new treatment for metastatic soft tissue sarcoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89,** 322–329 (2014).

77. Chawla, S. P. *et al.* Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30,** 78–84 (2012).

78. Belfiore, A., Genua, M. & Malaguarnera, R. PPAR-γ Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res.* **2009,** (2009).

79. Kuro-o, M. *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390,** 45–51 (1997).

80. Aunan, J. R., Cho, W. C. & Søreide, K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* **8,** 628–642 (2017).

81. Iseghohi, S. O. & Omage, K. How ageing increases cancer susceptibility: A tale of two opposing yet synergistic views. *Genes Dis.* **3,** 105–109 (2016).

82. Pawelec, G. & Solana, R. Are cancer and ageing different sides of the same coin? Conference on Cancer and Ageing. *EMBO Rep.* **9,** 234–238 (2008).

83. Finkel, T., Serrano, M. & Blasco, M. A. The common biology of cancer and ageing. *Nature* **448,** (2007).

84. Campisi, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75,** 685–705 (2013).

85. Falandry, C., Bonnefoy, M., Freyer, G. & Gilson, E. Biology of Cancer and Aging: A Complex Association With Cellular Senescence. *J. Clin. Oncol.* **32,** 2604–2610 (2014).

86. Matsumura, Y. *et al.* Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242,** 626–630 (1998).

87. Chen, C.-D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S. E. & Abraham, C. R. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 19796–19801 (2007).

88. Bloch, L. *et al.* Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett.* **583,** 3221–3224 (2009).

89. Chen, C.-D. *et al.* Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. *Biochemistry (Mosc.)* **53,** 5579–5587 (2014).

90. Shiraki-Iida, T. *et al.* Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* **424,** 6–10 (1998).

91. Imura, A. *et al.* alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* **316,** 1615–1618 (2007).

92. German, D. C., Khobahy, I., Pastor, J., Kuro-O, M. & Liu, X. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. *Neurobiol. Aging* **33,** 1483.e25-30 (2012).

93. Suzuki, M. *et al.* βKlotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* **22,** 1006–1014 (2008).

94. Wu, X. *et al.* Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling. *J. Biol. Chem.* **282,** 29069–29072 (2007).

95. Yamazaki, Y. *et al.* Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398,** 513–518 (2010).

96. Zhou, Q. *et al.* Role of Fosinopril and Valsartan on Klotho Gene Expression Induced by Angiotensin II in Rat Renal Tubular Epithelial Cells. *Kidney Blood Press. Res.* **33,** 186–192 (2010).

97. Xu, Z.-L., Gao, H., Ou-Yang, K.-Q., Cai, S.-X. & Hu, Y.-H. Establishment of a cell-based assay to screen regulators for Klotho gene promoter. *Acta Pharmacol. Sin.* **25,** 1165–1170 (2004).

98. Choi, B. H., Kim, C. G., Lim, Y., Lee, Y. H. & Shin, S. Y. Transcriptional activation of the human Klotho gene by epidermal growth factor in HEK293 cells; role of Egr-1. *Gene* **450,** 121–127 (2010).

99. Jung, D., Xu, Y. & Sun, Z. Induction of anti-aging gene klotho with a small chemical compound that demethylates CpG islands. *Oncotarget* **8,** 46745–46755 (2017).

100. Lau, W. L. *et al.* Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int.* **82,** 1261–1270 (2012).

101. Alcendor, R. R. *et al.* Sirt1 Regulates Aging and Resistance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ. Res.* **100,** 1512–1521 (2007).

102. Watanabe, R. *et al.* Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions. *Sci. Rep.* **7,** (2017).

103. Sugiura, H. *et al.* Recombinant human erythropoietin mitigates reductions in renal klotho expression. *Am. J. Nephrol.* **32,** 137–144 (2010).

104. Chen, L.-J., Cheng, M.-F., Ku, P.-M. & Lin, J.-W. Rosiglitazone Increases Cerebral Klotho Expression to Reverse Baroreflex in Type 1-Like Diabetic Rats. *BioMed Res. Int.* **2014,** (2014).

105. Avin, K. G. *et al.* Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front. Physiol.* **5,** (2014).

106. Mostafidi, E., Moeen, A., Nasri, H., Ghorbani Hagjo, A. & Ardalan, M. Serum Klotho Levels in Trained Athletes. *Nephro-Urol. Mon.* **8,** (2016).

107. Han, X. *et al.* Role of estrogen receptor α and β in preserving hippocampal function during aging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33,** 2671–2683 (2013).

108. Hsu, S.-C. *et al.* Testosterone increases renal anti-aging klotho gene expression via the androgen receptor-mediated pathway. *Biochem. J.* **464,** 221–229 (2014).

109. Hsu, S.-C. *et al.* Resveratrol increases anti-aging Klotho gene expression via the activating transcription factor 3/c-Jun complex-mediated signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53,** 361–371 (2014).

110. Marsell, R. *et al.* Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **23,** 827–833 (2008).

111. Yoon, H. E. *et al.* Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **26,** 800–813 (2011).

112. Zhou, L., Li, Y., Zhou, D., Tan, R. J. & Liu, Y. Loss of Klotho Contributes to Kidney Injury by Derepression of Wnt/β-Catenin Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24,** 771–785 (2013).

113. Moreno, J. A. *et al.* The inflammatory cytokines TWEAK and TNFα reduce renal klotho expression through NFκB. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22,** 1315–1325 (2011).

114. Kang, W.-L. & Xu, G.-S. Atrasentan increased the expression of klotho by mediating miR-199b-5p and prevented renal tubular injury in diabetic nephropathy. *Sci. Rep.* **6,** (2016).

115. Olauson, H., Mencke, R., Hillebrands, J.-L. & Larsson, T. E. Tissue expression and source of circulating αKlotho. *Bone* **100,** 19–35 (2017).

116. Lim, K. *et al.* α-Klotho Expression in Human Tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100,** E1308–E1318 (2015).

117. Ichikawa, S. *et al.* A homozygous missense mutation in human *KLOTHO* causes severe tumoral calcinosis. *J. Clin. Invest.* **117,** 2684–2691 (2007).

118. Brownstein, C. A. *et al.* A translocation causing increased alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 3455–3460 (2008).

119. Liu, C. *et al.* Klotho gene polymorphisms are related to colorectal cancer susceptibility. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8,** 7446–7449 (2015).

120. Jo, S.-H. *et al.* KLOTHO gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population. *Int. Heart. J.* **50,** 23–32 (2009).

121. Telci, D. *et al.* KLOTHO gene polymorphism of G395A is associated with kidney stones. *Am. J. Nephrol.* **33,** 337–343 (2011).

122. Kawano, K. *et al.* Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **17,** 1744–1751 (2002).

123. Friedman, D. J. *et al.* Klotho variants and chronic hemodialysis mortality. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **24,** 1847–1855 (2009).

124. Baldwin, C. *et al.* Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* **106,** 372–375 (2005).

125. Ogata, N. *et al.* Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone* **31,** 37–42 (2002).

126. Majumdar, V. & Christopher, R. Association of exonic variants of Klotho with metabolic syndrome in Asian Indians. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **412,** 1116–1121 (2011).

127. Rhee, E.-J. *et al.* The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism.* **55,** 1344–1351 (2006).

128. Xu, C. *et al.* Klotho gene polymorphism of rs3752472 is associated with the risk of urinary calculi in the population of Han nationality in Eastern China. *Gene* **526,** 494–497 (2013).

129. Arking, D. E. *et al.* Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 856–861 (2002).

130. Tucker Zhou, T. B., King, G. D., Chen, C. & Abraham, C. R. Biochemical and functional characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk. *J. Biol. Chem.* **288,** 36302–36311 (2013).

131. Dubal, D. B. *et al.* Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep.* **7,** 1065–1076 (2014).

132. Almeida, O. P. *et al.* Longevity Klotho gene polymorphism and the risk of dementia in older men. *Maturitas* **101,** 1–5 (2017).

133. Wolf, I. *et al.* Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin. *Oncogene* **29,** 26–33 (2010).

134. Laitman, Y. *et al.* The KL-VS sequence variant of Klotho and cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res. Treat.* **132,** 1119–1126 (2012).

135. Wang, L. *et al.* Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am. J. Cancer Res.* **1,** 111–119 (2011).

136. Xie, B. *et al.* Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer. *Cancer Cell Int.* **13,** 18 (2013).

137. Abramovitz, L. *et al.* KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17,** 4254–4266 (2011).

138. Xie, B. *et al.* Hmgb1 inhibits Klotho expression and malignant phenotype in melanoma cells by activating NF-κB. *Oncotarget* **7,** 80765–80782 (2016).

139. Pan, J. *et al.* Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **32,** 729–735 (2011).

140. Rubinek, T. *et al.* Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **133,** 649–657 (2012).

141. Gan, L., Pan, J., Chen, S., Zhong, J. & Wang, L. [DNA methylation of ZIC1 and KLOTHO gene promoters in colorectal carcinomas and its clinicopathological significance]. *Zhejiang Xue Xue Bao Yi Xue Ban J. Zhejiang Univ. Med. Sci.* **40,** 309–314 (2011).

142. Lee, J. *et al.* The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol. Cancer* **9,** 109 (2010).

143. Jiang, B., Gu, Y. & Chen, Y. Identification of novel predictive markers for the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Invest.* **32,** 218–225 (2014).

144. Xie, B. *et al.* Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* **44,** 795–801 (2013).

145. He, X.-J. *et al.* Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho. *BMC Cancer* **14,** 218 (2014).

146. Mehi, S. J., Maltare, A., Abraham, C. R. & King, G. D. MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro. *Age* **36,** 141–149 (2014).

147. Morishita, K. *et al.* The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutr.* **131,** 3182–3188 (2001).

148. Shimada, T. *et al.* Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* **113,** 561–568 (2004).

149. Hesse, M., Fröhlich, L. F., Zeitz, U., Lanske, B. & Erben, R. G. Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **26,** 75–84 (2007).

150. Ohnishi, M., Nakatani, T., Lanske, B. & Razzaque, M. S. Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of klotho knockout mice by deletion of vitamin D 1alpha-hydroxylase. *Kidney Int.* **75,** 1166–1172 (2009).

151. Nakatani, T. *et al.* In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J.* **23,** 433–441 (2009).

152. Fon Tacer, K. *et al.* Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **24,** 2050–2064 (2010).

153. Segawa, H. *et al.* Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **292,** F769–F779 (2007).

154. Hu, M. C. *et al.* Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24,** 3438–3450 (2010).

155. Tohyama, O. *et al.* Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* **279,** 9777–9784 (2004).

156. Huang, C.-L. Regulation of ion channels by secreted Klotho. *Adv. Exp. Med. Biol.* **728,** 100–106 (2012).

157. Woudenberg-Vrenken, T. E. *et al.* Characterization of vitamin D-deficient klotho(-/-) mice: do increased levels of serum 1,25(OH)2D3 cause disturbed calcium and phosphate homeostasis in klotho(-/-) mice? *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **27,** 4061–4068 (2012).

158. Alexander, R. T. *et al.* Klotho prevents renal calcium loss. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20,** 2371–2379 (2009).

159. Erben, R. G. & Andrukhova, O. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. *Bone* **100,** 62–68 (2017).

160. Chang, Q. *et al.* The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310,** 490–493 (2005).

161. Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R. J. & Hoenderop, J. G. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca2+ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **23,** 3397–3402 (2008).

162. Wolf, M. T. F., An, S.-W., Nie, M., Bal, M. S. & Huang, C.-L. Klotho up-regulates renal calcium channel transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) by intra- and extracellular N-glycosylation-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **289,** 35849–35857 (2014).

163. Cha, S.-K. *et al.* Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol. Pharmacol.* **76,** 38–46 (2009).

164. Welling, P. A. & Ho, K. A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **297,** F849–F863 (2009).

165. Lin, Y. & Sun, Z. Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6 β-cells. *Endocrinology* **153,** 3029–3039 (2012).

166. Kusaba, T. *et al.* Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca2+ channel to maintain endothelial integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 19308–19313 (2010).

167. Wu, Y.-L. *et al.* Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int.* **91,** 830–841 (2017).

168. Dalton, G. *et al.* Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114,** 752–757 (2017).

169. Wright, J. D. *et al.* Modeled structural basis for the recognition of α2-3-sialyllactose by soluble Klotho. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31,** 3574–3586 (2017).

170. Utsugi, T. *et al.* Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism.* **49,** 1118–1123 (2000).

171. Kurosu, H. *et al.* Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309,** 1829–1833 (2005).

172. Xie, B., Chen, J., Liu, B. & Zhan, J. Klotho Acts as a Tumor Suppressor in Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **19,** 611–617 (2013).

173. Girnita, L. *et al.* Inhibition of N-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. *Anticancer. Drug Des.* **15,** 67–72 (2000).

174. Sasaki, A. *et al.* Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **278,** 27896–27902 (2003).

175. Xie, J. *et al.* Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat. Commun.* **3,** 1238 (2012).

176. Seim, I. *et al.* Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat Myotis brandtii. *Nat. Commun.* **4,** (2013).

177. Ma, S. & Gladyshev, V. N. Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.007

178. Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T. & Kenyon, C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **141,** 1399–1406 (1995).

179. Clancy, D. J. *et al.* Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* **292,** 104–106 (2001).

180. Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C. & Paolisso, G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285,** E1064-1071 (2003).

181. Brown-Borg, H. M. Longevity in mice: is stress resistance a common factor? *Age Dordr. Neth.* **28,** 145–162 (2006).

182. Chiba, T., Yamaza, H. & Shimokawa, I. Role of Insulin and Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor-I Signaling in Lifespan Extension: Rodent Longevity Models for Studying Aging and Calorie Restriction. *Curr. Genomics* **8,** 423–428 (2007).

183. Murakami, S. Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp. Gerontol.* **41,** 1014–1019 (2006).

184. Sun, X., Chen, W.-D. & Wang, Y.-D. DAF-16/FOXO Transcription Factor in Aging and Longevity. *Front. Pharmacol.* **8,** 548 (2017).

185. Kim, D. H. *et al.* The roles of FoxOs in modulation of aging by calorie restriction. *Biogerontology* **16,** 1–14 (2015).

186. Mercken, E. M. *et al.* Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell* **12,** 645–651 (2013).

187. Madsen, M. A. *et al.* Altered oxidative stress response of the long-lived Snell dwarf mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318,** 998–1005 (2004).

188. Son, Y. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* **2011,** (2011).

189. Pfaffenbach, K. T. *et al.* GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. *J. Cell. Physiol.* **227,** 3803–3811 (2012).

190. Novosyadlyy, R. *et al.* Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* **15,** 1304–1317 (2008).

191. Sadighi Akha, A. A. *et al.* Heightened Induction of Proapoptotic Signals in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Primary Fibroblasts from a Mouse Model of Longevity. *J. Biol. Chem.* **286,** 30344–30351 (2011).

192. Henis-Korenblit, S. *et al.* Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 9730–9735 (2010).

193. Banerjee, S. *et al.* Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **31,** 659–672 (2013).

194. Song, S., Gao, P., Xiao, H., Xu, Y. & Si, L. Y. Klotho Suppresses Cardiomyocyte Apoptosis in Mice with Stress-Induced Cardiac Injury via Downregulation of Endoplasmic Reticulum Stress. *PLoS ONE* **8,** (2013).

195. Liu, Q.-F. *et al.* Ameliorating effect of Klotho on endoplasmic reticulum stress and renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Iran. J. Kidney Dis.* **9,** 291–297 (2015).

196. Laron, Z., Kauli, R., Lapkina, L. & Werner, H. IGF-I deficiency, longevity and cancer protection of patients with Laron syndrome. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **772,** 123–133 (2017).

197. Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R. A. & Harrison, D. E. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 6736–6741 (2001).

198. Bielschowsky, F. & Bielschowsky, M. Carcinogenesis in the Pituitary Dwarf Mouse. The Response to Dimethylbenzanthracene Applied to the Skin. *Br. J. Cancer* **15,** 257–262 (1961).

199. Rennels, E. G., Anigstein, D. M. & Anigstein, L. A cumulative study of the growth of sarcoma 180 in anterior pituitary dwarf mice. *Tex. Rep. Biol. Med.* **23,** 776–781 (1965).

200. Liu, H. *et al.* Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science* **317,** 803–806 (2007).

201. Yu, L., Meng, W., Ding, J. & Cheng, M. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473,** 455–461 (2016).

202. de Cavanagh, E. M. V., Inserra, F. & Ferder, L. Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria? *Cardiovasc. Res.* **89,** 31–40 (2011).

203. de Cavanagh, E. M. V., Inserra, F. & Ferder, L. Angiotensin II blockade: how its molecular targets may signal to mitochondria and slow aging. Coincidences with calorie restriction and mTOR inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309,** H15-44 (2015).

204. Mizuno, I., Takahashi, Y., Okimura, Y., Kaji, H. & Chihara, K. Upregulation of the klotho gene expression by thyroid hormone and during adipose differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.* **68,** 2917–2923 (2001).

205. Chihara, Y. *et al.* Klotho protein promotes adipocyte differentiation. *Endocrinology* **147,** 3835–3842 (2006).

206. Fan, J. & Sun, Z. The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34,** 1615–1625 (2016).

207. Yang, Y. *et al.* Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **27,** 2871–2884 (2017).

208. Chen, C.-D. *et al.* The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33,** 1927–1939 (2013).

209. Abraham, C. R., Mullen, P. C., Tucker-Zhou, T., Chen, C. D. & Zeldich, E. Chapter Nine - Klotho Is a Neuroprotective and Cognition-Enhancing Protein. in *Vitamins & Hormones* (ed. Litwack, G.) **101,** 215–238 (Academic Press, 2016).

210. Fujimaki, S., Wakabayashi, T., Takemasa, T., Asashima, M. & Kuwabara, T. The regulation of stem cell aging by Wnt signaling. *Histol. Histopathol.* **30,** 1411–1430 (2015).

211. Wehling-Henricks, M. *et al.* Klotho gene silencing promotes pathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **25,** 2465–2482 (2016).

212. Tang, X. *et al.* Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/β-catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **96,** 197–205 (2016).

213. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169,** 985–999 (2017).

214. Doi, S. *et al.* Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J. Biol. Chem.* **286,** 8655–8665 (2011).

215. Liu, Q.-F. *et al.* Klotho mitigates cyclosporine A (CsA)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and renal fibrosis in rats. *Int. Urol. Nephrol.* **49,** 345–352 (2017).

216. Maekawa, Y. *et al.* Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* **35,** 341–346 (2009).

217. Guan, X. *et al.* Klotho suppresses renal tubulo-interstitial fibrosis by controlling basic fibroblast growth factor-2 signalling. *J. Pathol.* **234,** 560–572 (2014).

218. Donate-Correa, J. *et al.* Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. *World J. Biol. Chem.* **6,** 351–357 (2015).

219. Corsetti, G. *et al.* Decreased expression of Klotho in cardiac atria biopsy samples from patients at higher risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* **13,** 701–711 (2016).

220. Saito, Y. *et al.* Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248,** 324–329 (1998).

221. Shimada, T. *et al.* Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation* **110,** 1148–1155 (2004).

222. Saito, Y. *et al.* In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276,** 767–772 (2000).

223. Nagai, T. *et al.* Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17,** 50–52 (2003).

224. Yamamoto, M. *et al.* Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.* **280,** 38029–38034 (2005).

225. Hu, M.-C. *et al.* The erythropoietin receptor is a downstream effector of Klotho-induced cytoprotection. *Kidney Int.* **84,** 468–481 (2013).

226. Rakugi, H. *et al.* Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine* **31,** 82–87 (2007).

227. Maltese, G. *et al.* The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells. *J. Cell. Mol. Med.* **21,** 621–627 (2017).

228. Laszczyk, A. M. *et al.* Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss. *Neurobiol. Aging* **59,** 41–54 (2017).

229. Dubal, D. B. *et al.* Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35,** 2358–2371 (2015).

230. Leon, J. *et al.* Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and α-Synuclein Transgenic Mice. *Cell Rep.* **20,** 1360–1371 (2017).

231. Inoue, S. *et al.* Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice. *Shock Augusta Ga* **39,** 311–316 (2013).

232. Okada, S. *et al.* Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (klotho) mice. *Int. Immunol.* **12,** 861–871 (2000).

233. Thurston, R. D. *et al.* Downregulation of aging-related Klotho gene in experimental colitis: the role of TNF and IFN-γ. *Gastroenterology* **138,** 1384–1394.e2 (2010).

234. Zhao, Y. *et al.* Klotho Depletion Contributes to Increased Inflammation in Kidney of the db/db Mouse Model of Diabetes via RelA (Serine)536 Phosphorylation. *Diabetes* **60,** 1907–1916 (2011).

235. Liu, F., Wu, S., Ren, H. & Gu, J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat. Cell Biol.* **13,** 254–262 (2011).

236. Ikushima, M. *et al.* Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339,** 827–832 (2006).

237. Carracedo, J. *et al.* Klotho modulates the stress response in human senescent endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.* **133,** 647–654 (2012).

238. Maekawa, Y. *et al.* Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr. Gerontol. Int.* **11,** 510–516 (2011).

239. Wahl, G. M. & Carr, A. M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.* **3,** E277-286 (2001).

240. de Oliveira, R. M. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* **580,** 5753–5758 (2006).

241. Buendía, P. *et al.* Klotho Prevents NFκB Translocation and Protects Endothelial Cell From Senescence Induced by Uremia. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **70,** 1198–1209 (2015).

242. Zhu, Y. *et al.* Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3β/Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* **104,** 663–671 (2013).

243. Li, X.-X. *et al.* Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway. *Int. J. Oncol.* **45,** 611–618 (2014).

244. Wolf, I. *et al.* Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* **27,** 7094–7105 (2008).

245. Lojkin, I. *et al.* Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* **362,** 149–157 (2015).

246. Tang, X. *et al.* Expression of klotho and β-catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. *Dis. Esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus* **29,** 207–214 (2016).

247. Chen, C.-D. *et al.* The anti-aging and tumor suppressor protein Klotho enhances differentiation of a human oligodendrocytic hybrid cell line. *J. Mol. Neurosci. MN* **55,** 76–90 (2015).

248. Feng, S., Dakhova, O., Creighton, C. J. & Ittmann, M. Endocrine fibroblast growth factor FGF19 promotes prostate cancer progression. *Cancer Res.* **73,** 2551–2562 (2013).

249. Chen, L. *et al.* Klotho endows hepatoma cells with resistance to anoikis via VEGFR2/PAK1 activation in hepatocellular carcinoma. *PloS One* **8,** e58413 (2013).

250. Lu, L. *et al.* Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer Invest.* **26,** 185–192 (2008).

251. Chang, B. *et al.* Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer. *Oncol. Rep.* **28,** 1022–1028 (2012).

252. Zhou, X. *et al.* Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **10,** 37 (2017).

253. Usuda, J. *et al.* Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer Amst. Neth.* **72,** 355–359 (2011).

254. Usuda, J. *et al.* Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer Amst. Neth.* **74,** 332–337 (2011).

255. Chen, B., Wang, X., Zhao, W. & Wu, J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **29,** 99 (2010).

256. Chen, B., Ma, X., Liu, S., Zhao, W. & Wu, J. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer Biol. Ther.* **13,** 1221–1228 (2012).

257. Chen, T. *et al.* Decreased Level of Klotho Contributes to Drug Resistance in Lung Cancer Cells: Involving in Klotho-Mediated Cell Autophagy. *DNA Cell Biol.* **35,** 751–757 (2016).

258. Wang, X. *et al.* Combined effects of klotho and soluble CD40 ligand on A549 lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **25,** 1465–1472 (2011).

259. Sun, H. *et al.* Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/β-catenin signaling pathway. *World J. Surg. Oncol.* **13,** 307 (2015).

260. Shu, G. *et al.* Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cell. Oncol. Dordr.* **36,** 121–129 (2013).

261. Dai, D. *et al.* Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1. *Oncol. Rep.* **35,** 552–558 (2016).

262. Wang, Y. *et al.* Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PloS One* **8,** e57391 (2013).

263. Camilli, T. C. *et al.* Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24,** 175–186 (2011).

264. Kasprzak, A., Kwasniewski, W., Adamek, A. & Gozdzicka-Jozefiak, A. Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **772,** 78–104 (2017).

265. Kasprowska-Liśkiewicz, D. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* **71,** 825–841 (2017).

266. Danielpour, D. & Song, K. Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17,** 59–74 (2006).

267. Zhan, T., Rindtorff, N. & Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **36,** 1461–1473 (2017).

268. Behera, R. *et al.* Inhibition of Age-Related Therapy Resistance in Melanoma by Rosiglitazone-Mediated Induction of Klotho. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23,** 3181–3190 (2017).

269. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420,** 860–867 (2002).

270. Qian, B.-Z. Inflammation fires up cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.006

271. Delbridge, A. R. D. & Strasser, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* **22,** 1071–1080 (2015).

272. Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N. & Gillet, G. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta* **1833,** 1755–1765 (2013).

273. Yahata, K. *et al.* Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310,** 128–134 (2003).

274. Fukino, K. *et al.* Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293,** 332–337 (2002).

275. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Lipp, P. Calcium - a life and death signal. *Nature* **395,** 645–648 (1998).

276. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1793,** 933–940 (2009).

277. Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **131,** 1047–1058 (2007).

278. Prins, D. & Michalak, M. Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3,** (2011).

279. Gomez-Villafuertes, R., Mellström, B. & Naranjo, J. R. Searching for a role of NCX/NCKX exchangers in neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **35,** 195–202 (2007).

280. Balaji, R. *et al.* Calcium spikes, waves and oscillations in a large, patterned epithelial tissue. *Sci. Rep.* **7,** 42786 (2017).

281. Lamont, C., Luther, P. W., Balke, C. W. & Wier, W. G. Intercellular Ca2+ waves in rat heart muscle. *J. Physiol.* **512,** 669–676 (1998).

282. Wu, D., Jia, Y., Zhan, X., Yang, L. & Liu, Q. Effects of gap junction to Ca(2+) and to IP(3) on the synchronization of intercellular calcium oscillations in hepatocytes. *Biophys. Chem.* **113,** 145–154 (2005).

283. Locovei, S., Wang, J. & Dahl, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* **580,** 239–244 (2006).

284. Catterall, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3,** (2011).

285. Badou, A., Jha, M. K., Matza, D. & Flavell, R. A. Emerging Roles of L-Type Voltage-Gated and Other Calcium Channels in T Lymphocytes. *Front. Immunol.* **4,** (2013).

286. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76,** 387–417 (2007).

287. Riccio, A. *et al.* mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* **109,** 95–104 (2002).

288. Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., Gupta, A., Karmase, A. & Boparai, R. K. Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacol. Rep. PR* **65,** 751–755 (2013).

289. Winn, M. P. *et al.* A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science* **308,** 1801–1804 (2005).

290. Kim, J.-H. *et al.* Klotho May Ameliorate Proteinuria by Targeting TRPC6 Channels in Podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28,** 140–151 (2017).

291. Ambrus, L. *et al.* Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **19,** 2771–2779 (2015).

292. Kwon, Y., Hofmann, T. & Montell, C. Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Mol. Cell* **25,** 491–503 (2007).

293. Shi, J. *et al.* Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J. Physiol.* **561,** 415–432 (2004).

294. Hisatsune, C. *et al.* Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279,** 18887–18894 (2004).

295. Horinouchi, T. *et al.* Adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca^{2+} entry mediated via transient receptor potential canonical 6 channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340,** 143–151 (2012).

296. Hall, G. *et al.* Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiontensin II-induced podocyte dysmotility via the protein kinase G-mediated downregulation of TRPC6 activity. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **306,** F1442–F1450 (2014).

297. Dietrich, A. *et al.* N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J. Biol. Chem.* **278,** 47842–47852 (2003).

298. Albarrán, L. *et al.* STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochem. J.* **463,** 373–381 (2014).

299. Ma, R., Chaudhari, S. & Li, W. Canonical Transient Receptor Potential 6 Channel: A New Target of Reactive Oxygen Species in Renal Physiology and Pathology. *Antioxid. Redox Signal.* **25,** 732–748 (2016).

300. Li, Y. *et al.* Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **434,** 894–898 (2005).

301. Kuwahara, K. *et al.* TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J. Clin. Invest.* **116,** 3114–3126 (2006).

302. Tian, D. *et al.* Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci. Signal.* **3,** ra77 (2010).

303. Van Petegem, F. Ryanodine Receptors: Structure and Function. *J. Biol. Chem.* **287,** 31624–31632 (2012).

304. Koulen, P. *et al.* Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* **4,** 191–197 (2002).

305. Wisnoskey, B. J., Sinkins, W. G. & Schilling, W. P. Activation of vanilloid receptor type I in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca2+ entry. *Biochem. J.* **372,** 517–528 (2003).

306. Thebault, S. *et al.* Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280,** 39423–39435 (2005).

307. Van Coppenolle, F. *et al.* Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J. Cell Sci.* **117,** 4135–4142 (2004).

308. Schäuble, N. *et al.* BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca2+ leakage from the ER. *EMBO J.* **31,** 3282–3296 (2012).

309. Verbert, L. *et al.* Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca2+ leak and disturbs Ca2+ signalling. *Biol. Cell* **100,** 39–49 (2008).

310. Vanden Abeele, F. *et al.* Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J. Cell Biol.* **174,** 535–546 (2006).

311. Lisak, D. A. *et al.* The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER CA2+-filling state. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853,** 2104–2114 (2015).

312. Rojas-Rivera, D. & Hetz, C. TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene* **34,** 269–280 (2015).

313. Bultynck, G. *et al.* The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca2+-permeable channel pore. *J. Biol. Chem.* **287,** 2544–2557 (2012).

314. Wegierski, T. *et al.* TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca2+ concentration in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **28,** 490–499 (2009).

315. Smyth, J. T. *et al.* Emerging perspectives in store-operated Ca2+ entry: Roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763,** 1147–1160 (2006).

316. Liao, Y. *et al.* Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 4682–4687 (2007).

317. Khadra, N. *et al.* CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca2+ entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) β2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 19072–19077 (2011).

318. Vacher, P. *et al.* Localized Store-Operated Calcium Influx Represses CD95-Dependent Apoptotic Effects of Rituximab in Non-Hodgkin B Lymphomas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195,** 2207–2215 (2015).

319. Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. & Healy, J. I. Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration. *Nature* **386,** 855–858 (1997).

320. Kaufman, R. J. & Malhotra, J. D. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1843,** 2233–2239 (2014).

321. Verfaillie, T. *et al.* PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* **19,** 1880–1891 (2012).

322. Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S. & Monteith, G. R. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1848,** 2502–2511 (2015).

323. Fiorio Pla, A., Kondratska, K. & Prevarskaya, N. STIM and ORAI proteins: crucial roles in hallmarks of cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **310,** C509-519 (2016).

324. Lehen'kyi, V. 'yacheslav & Prevarskaya, N. Oncogenic TRP channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* **704,** 929–945 (2011).

325. Chen, Y.-F., Chen, Y.-T., Chiu, W.-T. & Shen, M.-R. Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J. Biomed. Sci.* **20,** 23 (2013).

326. Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* **11,** 609–618 (2011).

327. Shapovalov, G., Ritaine, A., Skryma, R. & Prevarskaya, N. Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis. *Semin. Immunopathol.* **38,** 357–369 (2016).

328. Lee, J. M., Davis, F. M., Roberts-Thomson, S. J. & Monteith, G. R. Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca(2+) signaling in tumorigenesis: role of Ca(2+) transport. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301,** C969-976 (2011).

329. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. & Prevarskaya, N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26,** 7380–7385 (2007).

330. Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V. & Bonkhoff, H. Expression of the Ca2+-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22,** 7858–7861 (2003).

331. Faouzi, M. *et al.* Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **226,** 542–551 (2011).

332. Faouzi, M. *et al.* ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1833,** 752–760 (2013).

333. Tiedemann, K. *et al.* Breast Cancer-derived Factors Stimulate Osteoclastogenesis through the Ca2+/Protein Kinase C and Transforming Growth Factor-β/MAPK Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* **284,** 33662–33670 (2009).

334. Jaquemar, D., Schenker, T. & Trueb, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274,** 7325–7333 (1999).

335. Wang, L. *et al.* Targeting Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase 2 by Curcumin Induces ER Stress-Associated Apoptosis for Treating Human Liposarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **10,** 461–471 (2011).

336. Wang, L. *et al.* High expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 2b blocks cell differentiation in human liposarcoma cells. *Life Sci.* **99,** 37–43 (2014).

337. Hisaoka, M., Matsuyama, A. & Nakamoto, M. Aberrant calreticulin expression is involved in the dedifferentiation of dedifferentiated liposarcoma. *Am. J. Pathol.* **180,** 2076–2083 (2012).

338. Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. F. & Cheek, T. R. Store-operated Ca2+ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833,** 643–651 (2013).

339. Usachev, Y. M., Toutenhoofd, S. L., Goellner, G. M., Strehler, E. E. & Thayer, S. A. Differentiation induces up-regulation of plasma membrane Ca2+-ATPase and concomitant increase in Ca2+ efflux in human neuroblastoma cell line IMR-32. *J. Neurochem.* **76,** 1756–1765 (2001).

340. Varga, K. *et al.* Histone deacetylase inhibitor- and PMA-induced upregulation of PMCA4b enhances Ca2+ clearance from MCF-7 breast cancer cells. *Cell Calcium* **55,** 78–92 (2014).

341. Lee, W. J., Roberts-Thomson, S. J. & Monteith, G. R. Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337,** 779–783 (2005).

342. Ribiczey, P. *et al.* Isoform-specific up-regulation of plasma membrane Ca2+ATPase expression during colon and gastric cancer cell differentiation. *Cell Calcium* **42,** 590–605 (2007).

343. Arbabian, A. *et al.* Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J.* **280,** 5408–5418 (2013).

344. Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R. & Shuba, Y. Remodelling of Ca2+ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369,** (2014).

345. White, C. The Regulation of Tumor Cell Invasion and Metastasis by Endoplasmic Reticulum-to-Mitochondrial Ca(2+) Transfer. *Front. Oncol.* **7,** 171 (2017).

346. Fouqué, A. *et al.* The apoptotic members CD95, BclxL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca(2+) flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria. *Cell Death Differ.* **23,** 1702–1716 (2016).

347. Pazzaglia, L. *et al.* Activation of Metalloproteinases-2 and -9 by Interleukin-1α in S100A4-positive Liposarcoma Cell Line: Correlation with Cell Invasiveness. *Anticancer Res.* **24,** 967–972 (2004).

348. Vanoverberghe, K. *et al.* Ca2+ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* **11,** 321–330 (2004).

349. Flourakis, M. *et al.* Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **1,** e75 (2010).

350. Safa, A. R. c-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR. *Exp. Oncol.* **34,** 176–184 (2012).

351. Toescu, E. C. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca2+ increases. *Cell Calcium* **36,** 187–199 (2004).

352. Li, S. *et al.* Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1α in glioma cells under hypoxia. *J. Cell Sci.* **128,** 3317–3329 (2015).

353. Raphaël, M. *et al.* TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** E3870-3879 (2014).

354. Schaefer, E. A. M. *et al.* Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **85,** 426–438 (2013).

355. Bergner, A., Kellner, J., Tufman, A. & Huber, R. M. Endoplasmic reticulum Ca2+-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28,** 25 (2009).

356. Padar, S. *et al.* Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone. *Br. J. Pharmacol.* **142,** 305–316 (2004).

357. Colotti, G. *et al.* Sorcin, a calcium binding protein involved in the multidrug resistance mechanisms in cancer cells. *Mol. Basel Switz.* **19,** 13976–13989 (2014).

358. Gifford, J. B. & Hill, R. GRP78 Influences Chemoresistance and Prognosis in Cancer. *Curr. Drug Targets* (2017). doi:10.2174/1389450118666170615100918

359. Stoeckle, M. Y. *et al.* 78-kilodalton glucose-regulated protein is induced in Rous sarcoma virus-transformed cells independently of glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* **8,** 2675–2680 (1988).

360. Rong, Y.-P. *et al.* Targeting Bcl-2-IP3 Receptor Interaction to Reverse Bcl-2's Inhibition of Apoptotic Calcium Signals. *Mol. Cell* **31,** 255–265 (2008).

361. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* **4,** e838 (2013).

362. Bootman, M. D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J. B. & Rietdorf, K. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium* (2017). doi:10.1016/j.ceca.2017.08.005

363. Lodola, F. *et al.* Store-operated Ca2+ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PloS One* **7,** e42541 (2012).

364. Fiorio Pla, A. *et al.* TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene* **31,** 200–212 (2012).

365. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer* **2,** 466–474 (2011).

366. Farfariello, V., Iamshanova, O., Germain, E., Fliniaux, I. & Prevarskaya, N. Calcium homeostasis in cancer: A focus on senescence. *Biochim. Biophys. Acta* **1853,** 1974–1979 (2015).

367. Alfonso-De Matte, M. Y., Moses-Soto, H. & Kruk, P. A. Calcium-mediated telomerase activity in ovarian epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **399,** 239–244 (2002).

368. Rosenberger, S., Thorey, I. S., Werner, S. & Boukamp, P. A novel regulator of telomerase. S100A8 mediates differentiation-dependent and calcium-induced inhibition of telomerase activity in the human epidermal keratinocyte line HaCaT. *J. Biol. Chem.* **282,** 6126–6135 (2007).

369. Lin, J. *et al.* Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276,** 35037–35041 (2001).

370. Mueller, A. *et al.* The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **280,** 29186–29193 (2005).

371. Wiel, C. *et al.* Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* **5,** 3792 (2014).

372. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **5,** 99–118 (2010).

373. Gordon, R. R. & Nelson, P. S. Cellular Senescence and Cancer Chemotherapy Resistance. *Drug Resist. Updat.* **15,** 123–131 (2012).

374. Sage, J., Miller, A. L., Pérez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. & Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424,** 223–228 (2003).

375. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **27,** 5904–5912 (2008).

376. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313,** 1960–1964 (2006).

377. Sharma, B. & Kanwar, S. S. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Semin. Cancer Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.012

378. Vallabhapurapu, S. D. *et al.* Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget* **6,** 34375–34388 (2015).

379. Wiersma, V. R., Michalak, M., Abdullah, T. M., Bremer, E. & Eggleton, P. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Front. Oncol.* **5,** 7 (2015).

380. Garg, A. D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta* **1805,** 53–71 (2010).

381. Panaretakis, T. *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28,** 578–590 (2009).

382. Kepp, O. *et al.* Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24,** 311–318 (2013).

383. *Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines. Available at*.

384. Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines. Available at:

http://austinpublishinggroup.com/genetics-genomic-research/fulltext/ajggr-v2-id1014.php. (Accessed: 11th October 2016)

385. Trebak, M., Vazquez, G., Bird, G. S. J. & Putney, J. W. The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* **33,** 451–461 (2003).

386. Wang, C. *et al.* Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **41,** 167–179 (2016).

387. Schumacker, P. T. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. *Cancer Cell* **27,** 156–157 (2015).

388. Arora, S. *et al.* An undesired effect of chemotherapy: gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor κB- and hypoxia-inducible factor 1α-mediated up-regulation of CXCR4. *J. Biol. Chem.* **288,** 21197–21207 (2013).

389. Chakradeo, S., Elmore, L. W. & Gewirtz, D. A. Is Senescence Reversible? *Curr. Drug Targets* **17,** 460–466 (2016).

390. Kondratska, K. *et al.* Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* **1843,** 2263–2269 (2014).

391. Harper, M. T. & Poole, A. W. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores. *Blood* **119,** 4337–4338 (2012).

392. Casas-Rua, V. *et al.* STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853,** 233–243 (2015).

393. Erdmann, F. *et al.* Interaction of calmodulin with Sec61α limits Ca2+ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **30,** 17–31 (2011).

394. Friedlova, E. *et al.* The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin. *Neurochem. Int.* **56,** 363–366 (2010).

395. Chaudhuri, P. *et al.* Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI3 kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113,** 2110–2115 (2016).

396. Agell, N., Bachs, O., Rocamora, N. & Villalonga, P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell. Signal.* **14,** 649–654 (2002).

397. Dai, R., Chen, R. & Li, H. Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **34,** 1749–1757 (2009).

398. Jiang, C. C. *et al.* Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res.* **67,** 9750–9761 (2007).

399. Jiang, C. C. *et al.* Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* **68,** 6708–6717 (2008).

400. Yun, M.-S., Kim, S.-E., Jeon, S. H., Lee, J.-S. & Choi, K.-Y. Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J. Cell Sci.* **118,** 313–322 (2005).

401. Chuderland, D. & Seger, R. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Commun. Integr. Biol.* **1,** 4–5 (2008).

402. Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T. & Pae, H.-O. Chapter Two - Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. in *Methods in Enzymology* (eds. Cadenas, E. & Packer, L.) **528,** 27–48 (Academic Press, 2013).

403. Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. & Seger, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1813,** 1619–1633 (2011).

404. Tse, C. *et al.* ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **68,** 3421–3428 (2008).

405. Aresvik, D. M., Pettersen, R. D., Abrahamsen, T. G. & Wright, M. S. 5-Fluorouracil-induced Death of Jurkat T-Cells – A Role for Caspases and MCL-1. *Anticancer Res.* **30,** 3879–3887 (2010).

406. Cleary, J. M. *et al.* A phase I clinical trial of navitoclax, a targeted high-affinity Bcl-2 family inhibitor, in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* **32,** 937–945 (2014).

407. Okuda, I. *et al.* A large calcified retroperitoneal mass in a patient with chronic renal failure: liposarcoma with ossification. *Clin. Exp. Nephrol.* **14,** 185–189 (2010).

408. Lai, M.-Y. *et al.* Giant bilateral perinephric tumour and overt proteinuria. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **22,** 2089–2090 (2007).

409. Skinner, H. G. & Schwartz, G. G. Serum calcium and incident and fatal prostate cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **17,** 2302–2305 (2008).

410. Skinner, H. G. & Schwartz, G. G. A Prospective Study of Total and Ionized Serum Calcium and Fatal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **18,** 575–578 (2009).

411. Shi, H., Halvorsen, Y. D., Ellis, P. N., Wilkison, W. O. & Zemel, M. B. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol. Genomics* **3,** 75–82 (2000).

412. Mahalingam, D. *et al.* Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours. *Br. J. Cancer* **114,** 986–994 (2016).

413. Heitkötter, B. *et al.* Expression of PSMA in tumor neovasculature of high grade sarcomas including synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, undifferentiated sarcoma and MPNST. *Oncotarget* **8,** 4268–4276 (2016).

414. Wozniak, A. *et al.* Abstract 5197: Patient-derived xenograft (PDX) models of soft tissue sarcoma (STS): a preclinical platform for early drug testing. *Cancer Res.* **76,** 5197–5197 (2016).

415. Ireland, L. *et al.* Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer Res.* **76,** 6851–6863 (2016).

416. de-Freitas-Junior, J. C. M., Andrade-da-Costa, J., Silva, M. C. & Pinho, S. S. Glycans as Regulatory Elements of the Insulin/IGF System: Impact in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **18,** 1921 (2017).

417. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* **15,** nrc3982 (2015).

418. Benzekry, S., Beheshti, A., Hahnfeldt, P. & Hlatky, L. Capturing the Driving Role of Tumor-Host Crosstalk in a Dynamical Model of Tumor Growth. *Bio-Protoc.* **5,** (2015).

419. Baratchart, E. *et al.* Computational Modelling of Metastasis Development in Renal Cell Carcinoma. *PLoS Comput. Biol.* **11,** e1004626 (2015).

420. Sun, X., Bao, J. & Shao, Y. Mathematical Modeling of Therapy-induced Cancer Drug Resistance: Connecting Cancer Mechanisms to Population Survival Rates. *Sci. Rep.* **6,** (2016).

421. Ciccolini, J., Benzekry, S., Lacarelle, B., Barbolosi, D. & Barlési, F. Improving efficacy of the combination between antiangiogenic and chemotherapy: Time for mathematical modeling support. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** E3453 (2015).

422. Serre, R. *et al.* Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy. *Cancer Res.* **76,** 4931–4940 (2016).

423. Angermueller, C., Pärnamaa, T., Parts, L. & Stegle, O. Deep learning for computational biology. *Mol. Syst. Biol.* **12,** (2016).

424. Muhlestein, W. *et al.* Using a Novel Machine Learning Technique to Predict Brain Metastasis Velocity Following Stereotactic Radiosurgery for Brain Metastases. *Int. J. Radiat. Oncol.* **99,** E96 (2017).

ANNEXES

Liste des travaux en cours d'écriture ou de soumission

1. The anti-ageing protein Klotho sensitizes Dedifferentiated Liposarcoma cells to apoptosis by increasing ER Calcium leak and inhibiting MAPK signaling. (en cours de soumission à *Cell Death Differentiation*)
Delcroix V., Mauduit O., Tessier N., Montillaud A., Ducret T., Chibon F., Van Coppenolle F., Vacher P.

2. The BH3-mimetic ABT-263 potentiates gemcitabine-induced apoptosis in Dedifferentiated Liposarcomas. (en cours d'écriture)
Delcroix V., Mauduit O., Algeo MP., Derieppe MA, Montillaud A., Chibon F., Vacher P.

3. Characterization of the calcium signaling elicited by Insulin-like Growth Factor-1 in dedifferentiated liposarcoma cells. (en cours d'écriture)
Delcroix V., Ducret T., Chibon F., Vacher P.

7. CIA : a new software to simply analyze microscopy images.
Delcroix V., Ferré M., Lartigue L., Chibon F., Mauduit O. (En cours d'écriture)

4. RCBTB1: A novel prognostic factor for Sarcomas metastatic evolution acting through resistance to Docetaxel.
Mauduit O., Brulard C., Lesluyes T., Delcroix V., Perot G., Choublier N., Lartigue L., Michaud M., Lagarde P., Aurias A., Coindre JM., Blay JY., Chibon F. (En cours de soumission)

5. *DMD* : One gene but two distinct roles in myogenic sarcomas.
Mauduit O., Lesluyes T., Delcroix V., Perot G., Lagarde P., Aurias A., Coindre JM., Blay JY., Chibon F. (En cours d'écriture)

6. An overview of RCBTB1 : from gene to disease
Mauduit O., Delcroix V., Blay JY., Chibon F. (En cours d'écriture)

Communications

The anti-aging protein Klotho sensitizes liposarcoma cells to ER stress-induced apoptosis through a Ca^{2+}-dependent mechanism
Poster au congrès Cancer Cell Death and Therapy, 10-12 Mai 2017, Saint-Malo (France)

Rôle de la protéine Klotho dans la chimiorésistance des liposarcomes dédifférenciés
Présentation orale lors du congrès BIOSARC, 7 Octobre 2016, Strasbourg (France)

Formation

« Micsoscopie à épifluorescence et microscopie confocale », délivrée par le BIC (Bordeaux Imaging Center)

En annexes sont présentés les travaux publiés auxquels j'ai participé durant mes stages de Master et durant ma thèse :

1. The apoptotic members CD95, BclxL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca(2+) flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria. *Cell Death Differ. 2016 Oct;23(10):1702-16*
Fouqué A, Lepvrier E, Debure L, Gouriou Y, Malleter M, Delcroix V, Ovize M, Ducret T, Li C, Hammadi M, Vacher P, Legembre P.

Cet article traite de la signalisation non-apoptotique et pro-migratoire du ligand clivé de CD95. L'importance des transferts de calcium entre le RE et la mitochondrie est mise en évidence, de même que ses acteurs-clés : les protéines Bcl-2 et Bcl-xL qui modulent l'ouverture d'IP3R et de VDAC.

2. The antidepressant fluoxetine induces necrosis by energy depletion and mitochondrial calcium overload. *Oncotarget. 2017 Jan 10;8(2):3181-3196*
Charles E, Hammadi M, Kischel P, Delcroix V, Demaurex N, Castelbou C, Vacher AM, Devin A, Ducret T, Nunes P, Vacher P.

Les effets de l'anti-dépresseur fluoxetine sont étudiés sur l'homéostasie calcique intracellulaire des lymphocytes. La fluoxétine entraîne une fuite importante du calcium réticulaire par le translocon, active l'entrée capacitive de calcium, en inhibe la chaîne respiratoire. L'augmentation de la concentration calcique cytosolique entraîne une surcharge mitochondriale et la mort des cellules.

3. mTORC1 inhibition in cancer cells protects from glutaminolysis-mediated apoptosis during nutrient limitation. *Nat Commun. 2017 Jan 23;8:14124*
Villar VH, Nguyen TL, Delcroix V, Terés S, Bouchecareilh M, Salin B, Bodineau C, Vacher P, Priault M, Soubeyran P, Durán RV.

Ce travail met en évidence un effet délétère de l'inhibition de mTOR car ce dernier, en conditions de déprivation en glutamine, se comporte comme un suppresseur de tumeur et induit l'apoptose par inhibition de l'autophagie et activation de p62-caspase 8.

Cell Death and Differentiation (2016) 23, 1702–1716
Official journal of the Cell Death Differentiation Association
www.nature.com/cdd

OPEN

The apoptotic members CD95, BclxL, and Bcl-2 cooperate to promote cell migration by inducing Ca^{2+} flux from the endoplasmic reticulum to mitochondria

A Fouqué[1,2,3], E Lepvrier[1,2,3,4], L Debure[1,2,3], Y Gouriou[5], M Malleter[1,2,3,4], V Delcroix[6,7], M Ovize[5,8], T Ducret[6,9], C Li[10], M Hammadi[6,7], P Vacher[6,7,11] and P Legembre*[,1,2,3,11]

Metalloprotease-processed CD95L (cl-CD95L) is a soluble cytokine that implements a PI3K/Ca^{2+} signaling pathway in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. Accordingly, high levels of cl-CD95L in TNBC women correlate with poor prognosis, and administration of this ligand in an orthotopic xenograft mouse model accelerates the metastatic dissemination of TNBC cells. The molecular mechanism underlying CD95-mediated cell migration remains unknown. Here, we present genetic and pharmacologic evidence that the anti-apoptotic molecules BclxL and Bcl-2 and the pro-apoptotic factors BAD and BID cooperate to promote migration of TNBC cells stimulated with cl-CD95L. BclxL was distributed in both endoplasmic reticulum (ER) and mitochondrion membranes. The mitochondrion-localized isoform promoted cell migration by interacting with voltage-dependent anion channel 1 to orchestrate Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria in a BH3-dependent manner. Mitochondrial Ca^{2+} uniporter contributed to this flux, which favored ATP production and cell migration. In conclusion, this study reveals a novel molecular mechanism controlled by BclxL to promote cancer cell migration and supports the use of BH3 mimetics as therapeutic options not only to kill tumor cells but also to prevent metastatic dissemination in TNBCs.

Cell Death and Differentiation (2016) **23,** 1702–1716; doi:10.1038/cdd.2016.61; published online 1 July 2016

Apoptosis occurs through extrinsic and intrinsic signaling pathways. Whereas death receptors trigger the extrinsic apoptotic signal, mitochondria and their regulation by the Bcl-2 family implement the intrinsic pathway. Members of the Bcl-2 family (which share at least one of the four domains of Bcl-2 homology) are key regulators of the balance between cell life and death. They control mitochondrial membrane permeabilization allowing the liberation into the cytoplasm of apoptogenic factors including cytochrome c, which is responsible for the cascade of caspase activation. The functional activity of pro-survival members of the family (Bcl-2, BclxL, Bcl-w, Mcl-1, and A1) is to sequester the pro-apoptotic members BAX and BAK, which are the executioner molecules of mitochondrial membrane permeabilization. BH3-only proteins such as BAD release BAX/BAK from their sequestration by Bcl-2/BclxL, and thereby implement the cell death program.[1] Bcl-2 family proteins also have cellular functions beyond regulation of apoptosis. For instance, Bcl-2 and BclxL proteins regulate Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) by interacting with IP3R (for review see Monaco *et al.*[2]). Moreover, independent of its anti-apoptotic function, BclxL can exert a pro-metastatic role in breast and pancreatic cancer cells through a molecular mechanism that remains to be defined.[3–5]

CD95 (APO1/Fas) is a death receptor that has a pivotal role in immune homeostasis[6–8] and the elimination of infected and transformed cells in mice and humans (for review see Strasser *et al.*[9]). Its cognate ligand, CD95L (FasL), belongs to the tumor necrosis factor family. Full-length transmembrane CD95L can be cleaved by metalloproteases,[10] releasing a soluble ligand whose pathophysiological functions have been investigated only recently. A growing body of evidence indicates that this soluble ligand aggravates inflammation in chronic inflammatory disorders[11,12] and promotes oncogenesis[13–16] by inducing non-apoptotic signaling pathways such as NF-κB[11] and PI3K.[12]

Breast cancer represents a heterogeneous pathology in terms of molecular profiles and clinical outcomes. Triple-

[1]Inserm ER440-Oncogenesis, Stress and Signaling, Equipe Labellisée Ligue Contre Le Cancer, Rue Bataille Flandres Dunkerque, Rennes 35042, France; [2]Centre Eugène Marquis, Inserm ERL440-OSS, Rue Bataille Flandres Dunkerque, Rennes 35042, France; [3]Université de Rennes-1, 2 Avenue du Prof. Léon Bernard, Rennes 35043, France; [4]Laboratoire Commun, OncoTrial UMS Biosit/Biotrial 7-9 Rue Jean-Louis Bertrand, Rennes 35000, France; [5]Inserm U1060, CarMeN, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockfeller, Lyon 69373, France; [6]Université de Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, Bordeaux 33076, France; [7]Inserm U1218, Institut Bergonié, 229 Cours de l'Argonne, Bordeaux 33076, France; [8]Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Services D'explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires et CIC de Lyon, Lyon 69394, France; [9]Inserm U1045, Centre de Recherche Cardiothoracique de Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, Bordeaux 33076, France and [10]Molecular Targets Group, James Graham Brown Cancer Center, Departments of Medicine, and Pharmacology and Toxicology, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA
*Corresponding author: P Legembre, Centre Eugène Marquis, Inserm ERL440-OSS, Rue Bataille Flandres Dunkerque, 35042 Rennes, France. Tel: +33 223 237 241; E-mail: patrick.legembre@inserm.fr
[11]These authors share senior authorship.

Abbreviations: Bad, BCL2-associated agonist of cell death; Bak, BCL2-antagonist/killer; BAPTA-AM AM, 2 bis-(2-aminophenoxy)ethane-N; N; N'; N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester; Bax, BCL2-associated X protein; Bid, BH3 interacting domain death agonist; BH3, Bcl2-homology domain; GFP, Green fluorescent protein; IP3R, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; MCU, Mitochondrial calcium uniporter; MEF, Mouse embryonic fibroblast; NF-κB, Nuclear dactor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells; PI3K, Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; TNBC, Triple-negative breast cancer; VDAC, Voltage-dependent anion channel

Received 04.1.16; revised 26.5.16; accepted 03.6.16; Edited by S Nagata; published online 01.7.2016

negative breast cancers (TNBCs) are defined by a lack of expression of estrogen, progesterone, and HER2 receptors. Because of the absence of identified targets, treatment guidelines for patients with TNBC include only conventional chemotherapy, and thus prognosis remains significantly worse for these women than for other breast tumor patients benefiting from tailored therapies.[17,18] Accordingly, the development of new and targeted therapeutic strategies is required to improve the treatment efficiency of TNBC patients. We recently observed that among TNBC patients, high amounts of serum CD95L are correlated with poor prognosis and premature metastasis.[15] Of interest, soluble metalloprotease-cleaved CD95L (cl-CD95L) induces non-apoptotic signaling pathways that promote metastatic dissemination of TNBCs.[15] CD95L can also promote migration of colorectal cancer cells[13] and glioblastoma cells.[14] Nonetheless, the molecular mechanisms by which this receptor promotes oncogenesis remain to be identified.

Evasion from the apoptotic cell death program is a hallmark of cancer cells and is also an important mechanism to explain therapeutic failure.[19] To achieve this, cancer cells exhibit deregulation of many apoptotic factors. Of interest, the molecular mechanisms by which these molecules prevent cell death have been extensively studied, regardless of their non-apoptotic functions that may also help to accelerate carcinogenesis. Herein, we demonstrate that the anti-apoptotic factors Bcl-2 and BclxL collaborate to induce CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} upload, increasing ATP production and thereby promoting cell migration in TNBC.

Results

BclxL and Bcl-2 are instrumental in the CD95-induced cell migration. Because BclxL and Bcl-2 are instrumental in controlling CD95-mediated apoptotic signaling, we wondered whether these molecules also modulated CD95-mediated non-apoptotic signaling pathways. To address this question, we examined the effect of ABT-737 in TNBC cells exposed to cl-CD95L. The BH3 mimetic ABT-737 exhibits high-affinity binding to the hydrophobic BH3-binding groove of BclxL and Bcl-2, whereas it has a low affinity for Mcl-1.[20] Two TNBC cell lines were selected according to their resistance (BT549) or sensitivity (MDA-MB-231) to the ABT-737-mediated cell death pathway (Supplementary Figure S1A). Using the Boyden chamber assay, we observed that a non-toxic dose of ABT-737 abolished the migration of these TNBC cells stimulated with cl-CD95L (Figure 1a). Of interest, although ABT-737 treatment did not alter CD95-mediated Akt phosphorylation at serine 473 or threonine 308, two hallmarks of PI3K activation (Figure 1b), it abrogated the Ca^{2+} response (Figure 1c). To further investigate the role of BclxL and Bcl-2 in CD95-mediated cell migration, we next silenced Bcl-2 and BclxL in TNBC cells using shRNAs. To rule out misinterpretations due to off-target effects, we evaluated the molecular and biological effects of three different shRNAs targeting distinct sequences of the Bcl-2 and BclxL genes. Downregulation of Bclx in MDA-MB-231 (Figure 1d) and BT549 (Supplementary Figure S1B) cells did not affect Bcl-2 expression but inhibited cell migration when these TNBC cells were exposed to cl-CD95L (Figure 1e and Supplementary Figure S1C). Similarly, a reduction in Bcl-2 expression did not alter the BclxL expression level (Figure 1f and Supplementary Figure S1D) but inhibited CD95-induced cell motility (Figure 1g and Supplementary Figure S1E). In agreement with the BH3 mimetic data, downregulation of BclxL and Bcl-2 in TNBC cells did not inhibit the CD95-mediated PI3K signaling pathway and even enhanced it (Supplementary Figure S1F), suggesting that BclxL and Bcl-2 exert a BH3-independent negative regulatory function in the CD95-mediated PI3K response. Because downregulation of Bcl-2 and BclxL expression abrogated the CD95-mediated Ca^{2+} response (Figure 1h), these findings suggest that Bcl-2 and BclxL promote cell migration by modulating this Ca^{2+} response.

BclxL localization in mitochondrial membranes triggers CD95-mediated cell migration. Bcl-2 and BclxL prevent the release of cytochrome c in response to many apoptotic stimuli.[21–23] However, Bcl-2 and BclxL also associate with other cytoplasmic membranes, notably those of the ER,[24] raising the possibility that they exert different functions according to their cellular distribution. It is noteworthy that loss of BclxL or its reconstitution in Bclx-knockout (KO) MEFs did not affect the expression level of CD95 (Figure 2a). BclxL was targeted to the outer mitochondrial membrane by replacing its membrane anchor with the mitochondrial insertion sequence of the listerial protein ActA (BclxL-MT) and to the ER membrane with the ER-specific sequence of cytochrome b5 (CytB5; BclxL-ER).[25] To validate the cellular localization of these constructs, we fused each membrane sequence to GFP (Supplementary Figure S2A) and analyzed the distribution of GFP compared with that of ER and mitochondrion trackers using confocal microscopy (Supplementary Figure S2B). GFP-ActA co-localized with the mitochondrion tracker but not with the ER tracker, whereas the opposite was observed with the GFP-fused CytB5 sequence (Supplementary Figure S2B), confirming that these sequences selectively distributed BclxL to the expected organelles.

The trivial cytosolic calcium response observed in $MEF^{BclxL-/-}$ stimulated with cl-CD95L was increased in cells reconstituted with BclxL-WT (Figure 2b). BclxL-ER evoked a CD95-mediated cytosolic Ca^{2+} response similar to that in MEFs reconstituted with BclxL-WT (Figure 2b). By contrast, BclxL-MT failed to restore the cytosolic Ca^{2+} response in these cells (Figure 2b). Importantly, although $MEF^{BclxL-/-}$ did not migrate in the presence of cl-CD95L (Figure 2c), reconstitution of these cells with BclxL-WT restored CD95-mediated cell motility (Figure 2c). Unexpectedly, although BclxL-ER induced a cytosolic Ca^{2+} response similar to that provoked by BclxL-WT, it failed to trigger cell migration in the presence of cl-CD95L (Figure 2c). By contrast, BclxL-MT did not restore the CD95-mediated cytosolic Ca^{2+} response, but induced cell migration in a manner similar to BclxL-WT-expressing MEFs (Figure 2c). These latter results encouraged us to re-evaluate the role of Ca^{2+} in CD95-mediated migration of MEFs. The Ca^{2+} chelator BAPTA-AM completely inhibited motility of MEFs stimulated with cl-CD95L (Figure 2d), confirming that Ca^{2+} was instrumental in this cellular process.

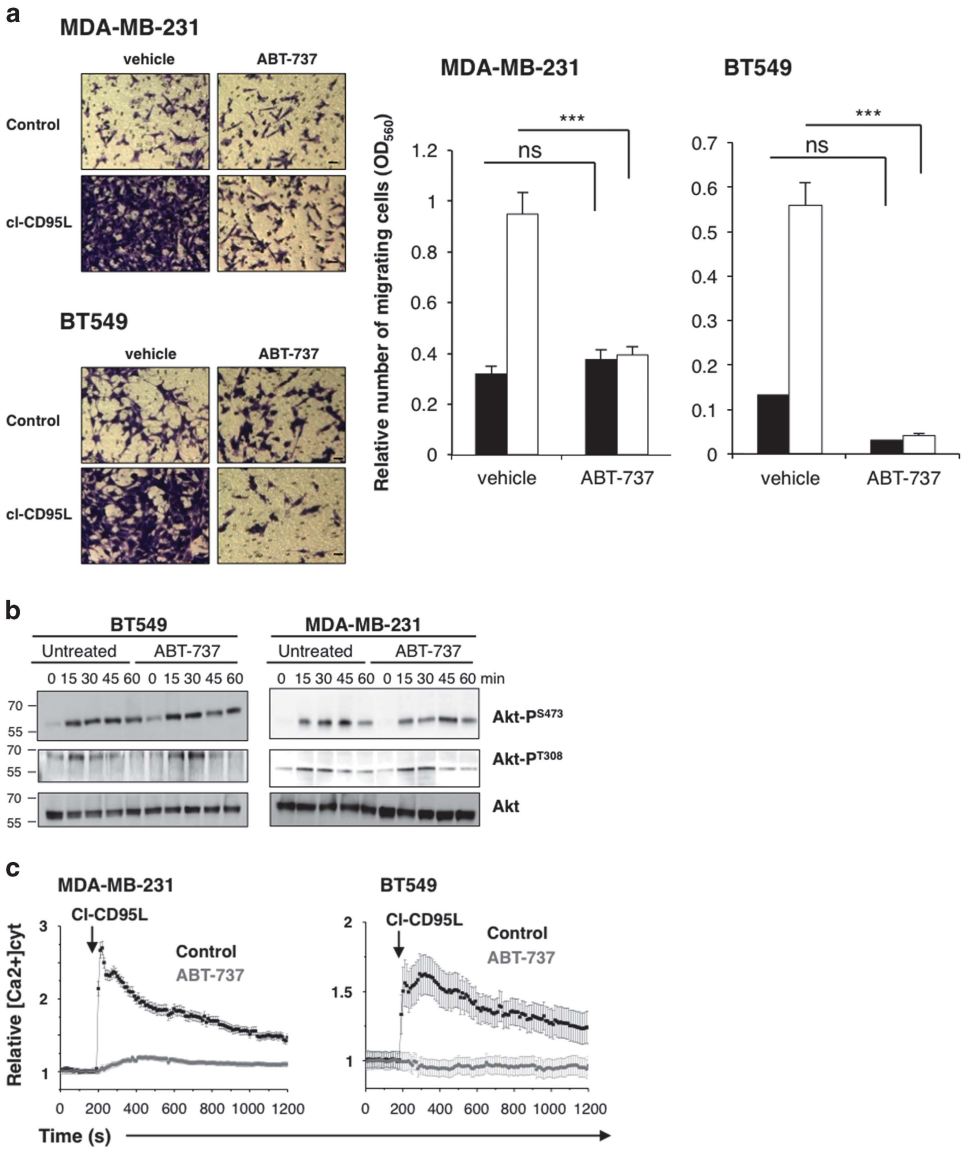


Figure 1 CD95 induces a BH3-dependent calcium signal that promotes TNBC cell motility. (**a**) MDA-MB-231 and BT549 cells were pre-incubated for 1 h in the presence of 0.1 and 10 μM ABT-737, respectively, and then treated or untreated with cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Cell migration was evaluated by the Boyden chamber assay. Migrating cells were fixed and stained with Giemsa. For each experiment, five images of random fields were acquired. To quantify cell migration, migrating cells were lysed and absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of three independently performed experiments (***$P<0.001$; two-way Mann-Whitney). Bars = 50 μm. (**b**) MDA-MB-231 and BT549 cells were pre-incubated for 1 h with or without non-toxic doses of ABT-737 (0.1 and 10 μM, respectively) and then treated or untreated with cl-CD95L (100 ng/ml) for the indicated amount of time. Cells were lysed and immunoblotting was performed as indicated. Akt was used as a loading control. (**c**) MDA-MB-231 and BT549 cells were pre-incubated for 1 h in the presence or absence of ABT-737 (0.1 μM). Cells were loaded with the Ca^{2+} probe FuraPE3 and then stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml). The cytosolic calcium concentration was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}{}_{[CYT]}$). Data represent the mean $\pm$ s.e. of the mean of F/F_0 ($n>50$ cells, at least three independent experiments). (**d**) MDA-MB-231 cells were infected with lentiviruses encoding shRNAs targeting different regions of Bclx mRNA. After puromycin selection, cells were lysed and the amounts of BclxL and Bcl-2 were evaluated by immunoblotting. β-Actin served as a loading control. (**e**) Migration of cells depicted in (**d**) was assessed using the Boyden chamber assay in the presence or absence of cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Migrating cells were fixed, stained (Giemsa), and lysed. Absorbance of migrating cells was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of three independently performed experiments (**$P<0.01$, *$P<0.05$; two-way Mann-Whitney). (**f**) MDA-MB-231 cells were transduced with lentiviruses encoding shRNAs targeting different regions of Bcl-2. After puromycin selection, cells were lysed and the expression levels of Bcl-2 and BclxL were evaluated by immunoblotting. β-Actin served as a loading control. (**g**) Migration of cells depicted in (**f**) was evaluated by the Boyden chamber assay in the presence or absence of cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Migrating cells were fixed, stained (Giemsa), and lysed. Absorbance of migrating cells was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean $\pm$ s.e. of the mean of three independently performed experiments (**$P<0.01$; two-way Mann-Whitney). (**h**) The calcium response was assessed in MDA-MB-231 cells infected with lentiviruses encoding various shRNAs targeting BclxL (left panel) or Bcl-2 (right panel). Cells were loaded with the Ca^{2+} probe Fluo2 and then stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml). The cytosolic calcium concentration was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}{}_{[CYT]}$). Data represent the mean $\pm$ s.e. of the mean of F/F_0 measured in GFP-positive cells ($n>50$ cells, at least three independent experiments)

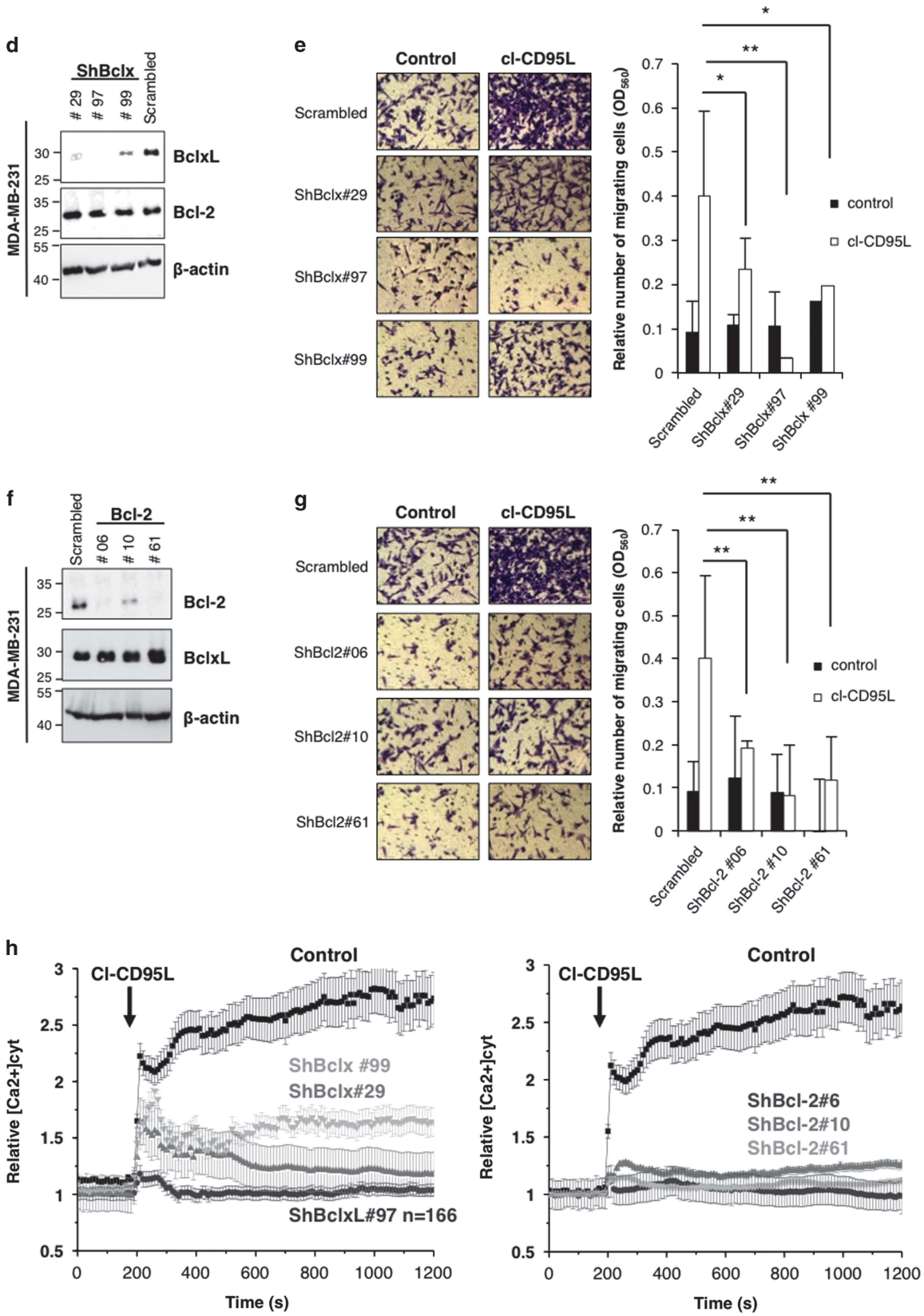


Figure 1 Continued

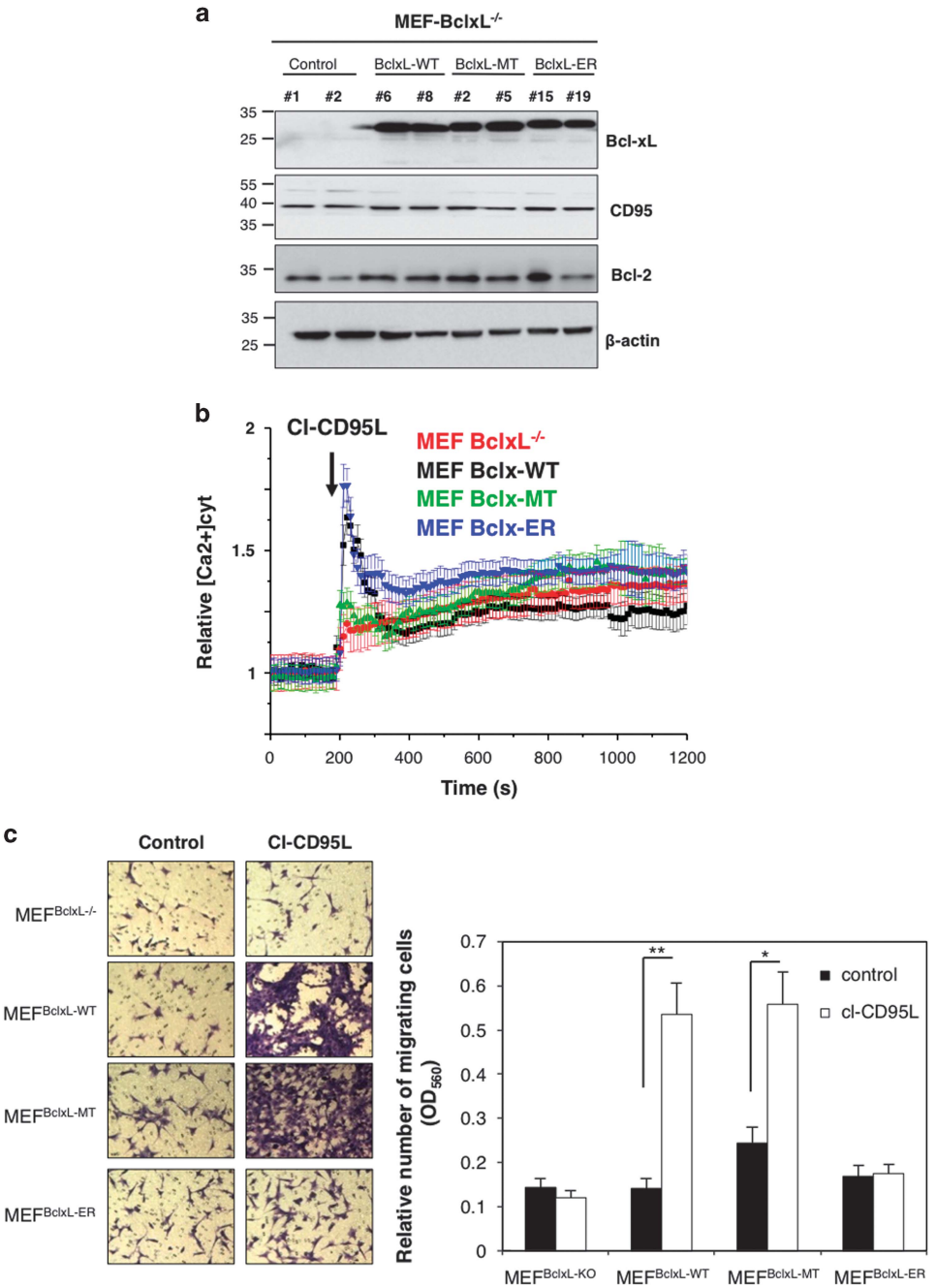


Figure 2 BclxL-MT is instrumental in cell migration**.** (**a**) Bclx-KO MEFs and their counterparts reconstituted with BclxL-ER, BclxL-MT, or BclxL-WT were lysed, and the expression levels of the indicated proteins were assessed by immunoblotting. Numbers indicate different clones. (**b**) The indicated MEFs were loaded with the Ca^{2+} probe FuraPE3 and then stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml). The cytosolic calcium concentration was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}_{[CYT]}$). Data represent the mean ± s.e. of the mean of F/F_0 in GFP-positive cells ($n > 50$ cells, at least three independent experiments). (**c**) Migration of the indicated MEFs treated with or without cl-CD95L (100 ng/ml) was evaluated using the Boyden chamber assay. After 24 h, migrating cells were fixed, stained with Giemsa, and lysed. Absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean ± s.e. of the mean of three independently performed experiments (**$P < 0.01$, *$P < 0.05$; two-way Mann-Whitney). (**d**) Parental MEFs were pre-incubated for 1 h in the presence or absence of a non-toxic dose of BAPTA-AM (5 μM) and then stimulated with or without cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Cell migration was analyzed using the Boyden chamber assay. Migrating cells were stained with Giemsa. Data are representative of three independently performed experiments. (**e**) $MEF^{BclxL\text{-}MT}$ were loaded with the Ca^{2+} probe FuraPE3 and pre-incubated for 1 h in the presence or absence of a non-toxic dose of ABT-199 (1 μM). Cells were then stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml) and the cytosolic calcium concentration was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}_{[CYT]}$). Data represent the mean ± standard error of F/F_0 ($n > 50$ cells, at least three independent experiments). (**f**) $MEF^{BclxL\text{-}WT}$ and $MEF^{BclxL\text{-}MT}$ were pre-treated for 1 h with or without (control) a non-toxic dose of ABT-199 (1 μM) and then stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Cell migration was assessed by the Boyden chamber assay. Migrating cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. Absorbance of migrating cells was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean ± standard deviation of three independently performed experiments (**$P < 0.01$; two-way Mann-Whitney)

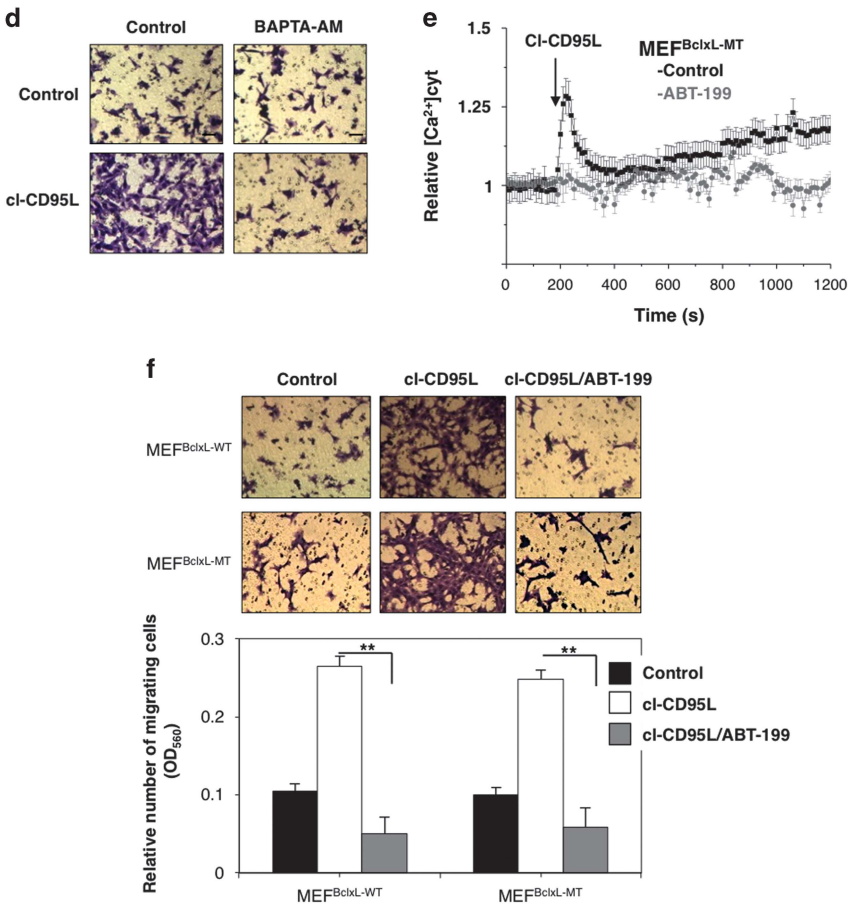


Figure 2 Continued

ABT-199 is a BH3 mimetic that selectively targets Bcl-2.[26] ABT-199 treatment abrogated the residual intracellular Ca^{2+} response observed in BclxL-MT-expressing MEFs stimulated with cl-CD95L (Figure 2e) and prevented migration of both BclxL-WT- and BclxL-MT-expressing MEFs (Figure 2f), indicating that Bcl-2 and mitochondrial BclxL cooperate to induce CD95-mediated cell motility. Because BclxL localization to mitochondria is mandatory to trigger CD95-mediated cell migration and mitochondria have a calcium-buffering ability,[27] we wondered whether BclxL orchestrated CD95-mediated cell migration by promoting mitochondrial Ca^{2+} uptake. The Ca^{2+} concentration in the mitochondrial matrix was assessed using confocal microscopy and the mitochondrion-restricted Ca^{2+} probe Rhod2 (Figure 3a). Whereas the Ca^{2+} concentration in mitochondria of $MEF^{BclxL-/-}$ did not change in the presence of cl-CD95L, rapid and transient Ca^{2+} accumulation was observed in mitochondria of BclxL-WT-reconstituted cells (Figure 3b). Although BclxL-ER restored the CD95-mediated cytosolic Ca^{2+} response (Figure 2b), it failed to trigger mitochondrial Ca^{2+} uptake (Figure 3c). Importantly, reconstitution of $MEF^{BclxL-/-}$ with BclxL-MT restored CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} loading (Figure 3d), which was abolished by ABT-199 (Figure 3e). These findings clearly indicated that mitochondrial distribution of BclxL is mandatory for CD95-mediated cell migration and Bcl-2 and BclxL cooperate to elicit mitochondrial Ca^{2+} uptake in cells exposed to cl-CD95L.

BID and BAD participate in CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} influx. BAD is a BH3-only protein that forms a heterodimer with BclxL to displace its interaction with BAX and induces the mitochondrion-dependent apoptotic response.[28] BAD also contributes to glucose-driven mitochondrial respiration by modulating glucokinase activity.[29] Because BclxL and Bcl-2 prevented Akt activation in cells exposed to cl-CD95L (Supplementary Figure S1F) and Akt phosphorylates BAD to sequester it in the cytosol and block its redistribution to mitochondria,[30,31] we next examined whether BAD contributed to CD95-driven cell migration. Knockout of BAD (Supplementary Figure S3A) enhanced CD95-mediated Akt activation (Supplementary Figure S3B), suggesting that BclxL, Bcl-2, and BAD exert a negative regulatory activity on Akt phosphorylation. More importantly, BAD-KO cells stimulated with cl-CD95L did not exhibit mitochondrial Ca^{2+} uptake (Supplementary Figure S3C). In cells stimulated with cl-CD95L, BclxL interacted with BAD (Supplementary Figure S3D) and this association was inhibited using the BH3 mimetic ABT-737 (Supplementary Figure S3D). In addition, BAD-KO MEFs failed to migrate in the presence of cl-CD95L (Supplementary Figure S3E), showing that CD95 recruits part of the classical apoptotic

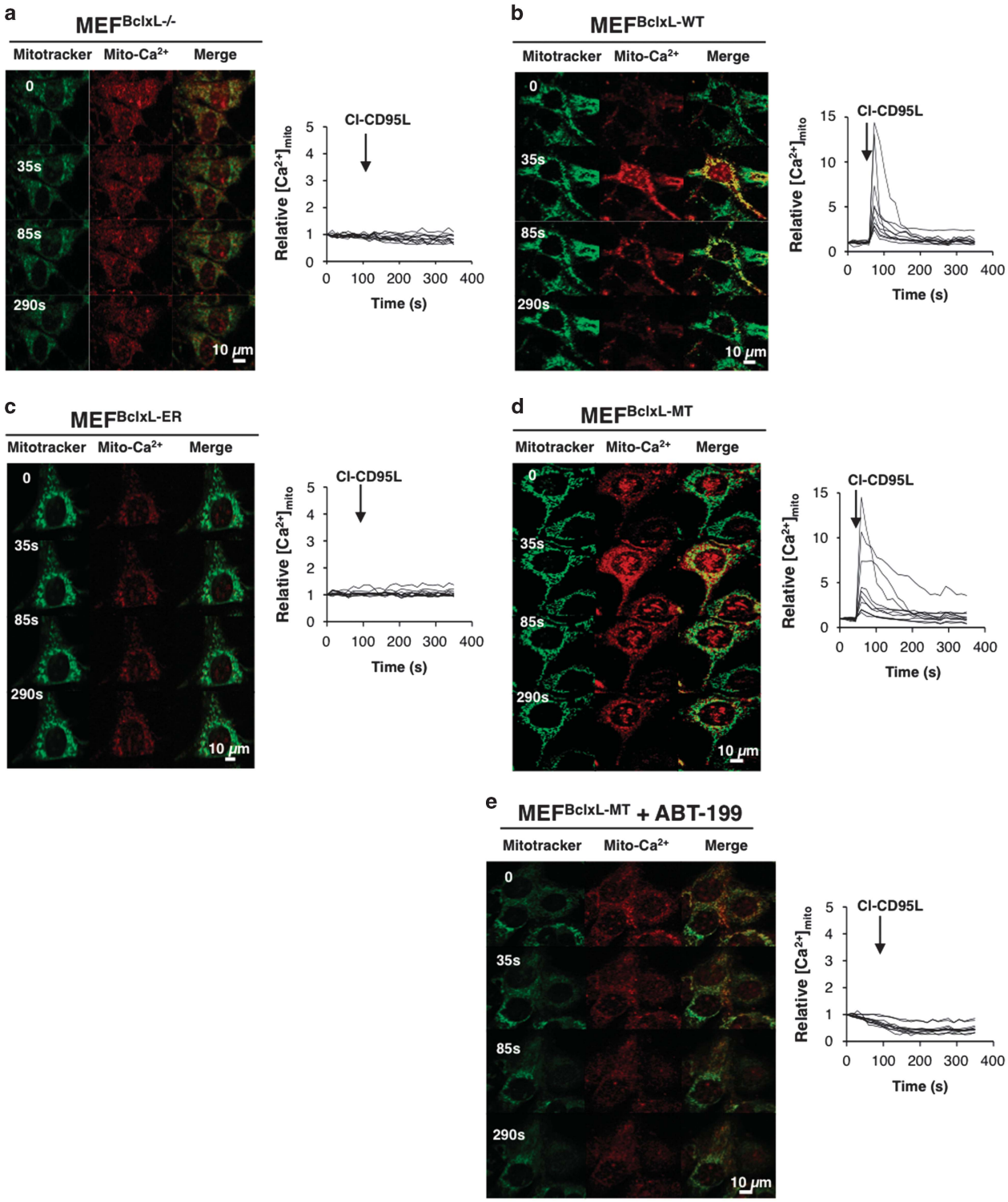


Figure 3 BclxL-MT orchestrates CD95-mediated calcium influx in the mitochondrial matrix. Bclx-deficient MEFs (**a**) reconstituted with BclxL-WT (**b**), BclxL-ER (**c**), or BclxL-MT (**d**) were loaded with the mitochondrial Ca^{2+} probe (Rhod2, red) and cell-permeable Mitotracker (green) to label mitochondria. Left panels: confocal images of cells stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml) for the indicated amount of time. Right panels: a region of interest was drawn in the Mitotracker-positive region (mitochondria) and fluorescence of the Ca^{2+} probe Rhod2 was monitored in this region. Graphs depict the overlay of the mitochondrial calcium response of 10 representative cells exposed to cl-CD95L. (**e**) The same experimental protocol was used as in (**d**), except that cells were pre-incubated for 1 h with a non-toxic dose of ABT-199 (1 μM). Images show t_0, t_0+35 s, t_0+85 s, and t_0+290 s of cells stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml)

machinery in the presence of cl-CD95L to trigger a non-apoptotic signaling pathway that promotes cell migration. BID is another BH3-only protein involved in CD95-mediated cell death.[32,33] Indeed, CD95 activation leads to BID truncation (tBID) through a caspase-8-driven process and tBID is pivotal to induce mitochondrial outer membrane permeabilization and cell death.[32] In agreement with the role of BID in the CD95-mediated apoptotic signal, BID-KO MEF cells did not die in the presence of a cytotoxic CD95L designated Ig-CD95L[34] (Supplementary Figure S3F). Cells lacking BID triggered a cytosolic Ca^{2+} response similar to that observed in parental MEF cells when exposed to cl-CD95L (Supplementary Figure S3G) indicating that BID is not involved in Ca^{2+} release from the ER to the cytosol in cells exposed to cl-CD95L. By contrast, the mitochondrial Ca^{2+} uptake observed in parental MEF cells was abrogated in BID-KO MEF (Supplementary Figure S3H), which also failed to migrate in presence of cl-CD95L (Supplementary Figure S3I). Finally, although stimulation of MEF or BT549 cells with Ig-CD95L induced BID cleavage (Supplementary Figures S3J and S3K), BID was not processed in cells exposed to cl-CD95L (Supplementary Figures S3J and S3K), indicating that unlike the apoptotic signal, BID cleavage is not a pre-requisite to trigger CD95-mediated cell migration.

BAX and BAK are two pro-apoptotic Bcl-2 members orchestrating mitochondrial outer membrane permeabilization and thereby implementing the apoptotic signal. Although these molecules contributed to the CD95-mediated apoptotic signal (Supplementary Figure S3F), the loss of BAX and BAK did not impair the CD95-mediated cytosolic response (Supplementary Figure S3L) and even seemed to enhance this signal (Supplementary Figure S3L). Also, the CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} upload in MEF cells lacking BAX and BAK remained unaffected (Supplementary Figure S3M). Finally, BAX/BAK double KO MEF cells as well as parental MEF cells migrated when exposed to cl-CD95L (Supplementary Figure S3I) indicating that BAX and BAK were not involved in the CD95-mediated non-apoptotic signaling pathway. Overall, these findings highlighted that unlike BAX and BAK, BAD and BID contributed to the CD95-mediated non-apoptotic signaling pathway by promoting the Ca^{2+} flux into mitochondria.

Downregulation of BclxL in TNBC cells inhibits CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} uptake. To address whether similarly to MEFs, BclxL orchestrated CD95-mediated migration in TNBC cells, we silenced endogenous BclxL in a TNBC cell line ($BT549^{ShBclx}$) using shRNAs targeting its 3′ untranslated region and reconstituted cells with BclxL-WT, BclxL-MT, or BclxL-ER constructs devoid of the 3′ untranslated region (Figure 4a). Reconstitution of $BT549^{ShBclx}$ with BclxL-WT or BclxL-ER restored the CD95-mediated cytosolic Ca^{2+} response (Figure 4b), while BclxL-MT failed to implement this signal (Figure 4b). Silencing of BclxL expression in BT549 cells inhibited CD95-mediated cell migration in comparison with parental TNBC cells (Figure 4c). On the other hand, $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with BclxL-WT or BclxL-MT migrated when stimulated with cl-CD95L, whereas BclxL-ER failed to restore migration of $BT549^{ShBclx}$ (Figure 4c). In agreement with the MEF data, BclxL-WT and BclxL-MT led to mitochondrial Ca^{2+} loading in TNBC cells exposed to cl-CD95L (Supplementary Figure S4A), whereas BclxL-ER did not (Supplementary Figure S4A), confirming that BclxL residing in the outer membrane of mitochondria was mandatory to trigger Ca^{2+} loading of the organelle. Importantly, ABT-199 treatment abrogated the CD95-mediated residual cytosolic Ca^{2+} response (Figure 4d), ion accumulation in the mitochondrial matrix (Supplementary Figure S4B), and migration (Figure 4e) in BclxL-MT-expressing $BT549^{ShBclx}$ exposed to cl-CD95L. These results clearly demonstrated that Bcl-2 and BclxL cooperate to induce mitochondrial Ca^{2+} loading and migration of TNBC cells exposed to cl-CD95L.

BclxL interacts with voltage-dependent anion channel (VDAC) 1 and modulates mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) to promote cell migration. Recent data showed that BclxL interacts with isoforms 1 and 3 of VDAC at the outer mitochondrial membrane to activate mitochondrial Ca^{2+} uptake and modulate cell death.[35,36] BclxL immunoprecipitation revealed that VDAC3 was not present in the immune complex formed in cells stimulated with cl-CD95L (data not shown). On the other hand, although no association between BclxL and VDAC1 was detected in BclxL-ER-expressing MEFs (Figure 5a), BclxL interacted with VDAC1 in BclxL-MT-expressing MEFs stimulated with cl-CD95L (Figure 5a). Using co-immunoprecipitation (Figure 5b) and proximity ligation assay (Supplementary Figure S5A), we observed that a residual level of BclxL (wild type and MT) interacted with VDAC1 in unstimulated $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with BclxL-WT or BclxL-MT cells (Supplementary Figure S5A), whereas no such interactions were detected in $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with an empty vector or with BclxL-ER (Supplementary Figure S5A). Furthermore, the number of VDAC1/BclxL interactions significantly increased in BclxL-WT (Supplementary Figure S5A)- and BclxL-MT-expressing $BT549^{ShBclx}$ cells exposed to cl-CD95L (Figure 5b and Supplementary Figure S5A), whereas we did not observe VDAC1/BclxL interaction in empty vector or BclxL-ER-expressing $BT549^{ShBclx}$ (Figure 5b and Supplementary Figure S5A). Also, cell-permeant N-terminal (amino acids 10–26 of VDAC1) and L14-15 (amino acids 208–218 of VDAC1) peptides, which alter binding of BclxL to VDAC1/3,[35] completely inhibited CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} influx (Figure 5c and Supplementary Figure S5B) and cell migration (Figure 5d and Supplementary Figure S5C) in MEFs and TNBC cells. Ca^{2+} can accumulate in the mitochondrial matrix through activation of MCU residing in the inner mitochondrial membrane.[37,38] Pre-treatment of $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with BclxL-WT or BclxL-MT with a selective MCU inhibitor, Ru360,[38] not only prevented CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} influx (Figure 6a) but also abrogated cell migration (Figure 6b). Inhibition of MCU activity also inhibited CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} loading (Supplementary Figure S6A) and cell migration (Supplementary Figure S6B) in MEF cells. Because it was recently reported that short-term Ca^{2+} loading in mitochondria can drive ATP production,[39] we asked whether mitochondrial Ca^{2+} accumulation observed in cancer cells stimulated with cl-CD95L was instrumental in producing the

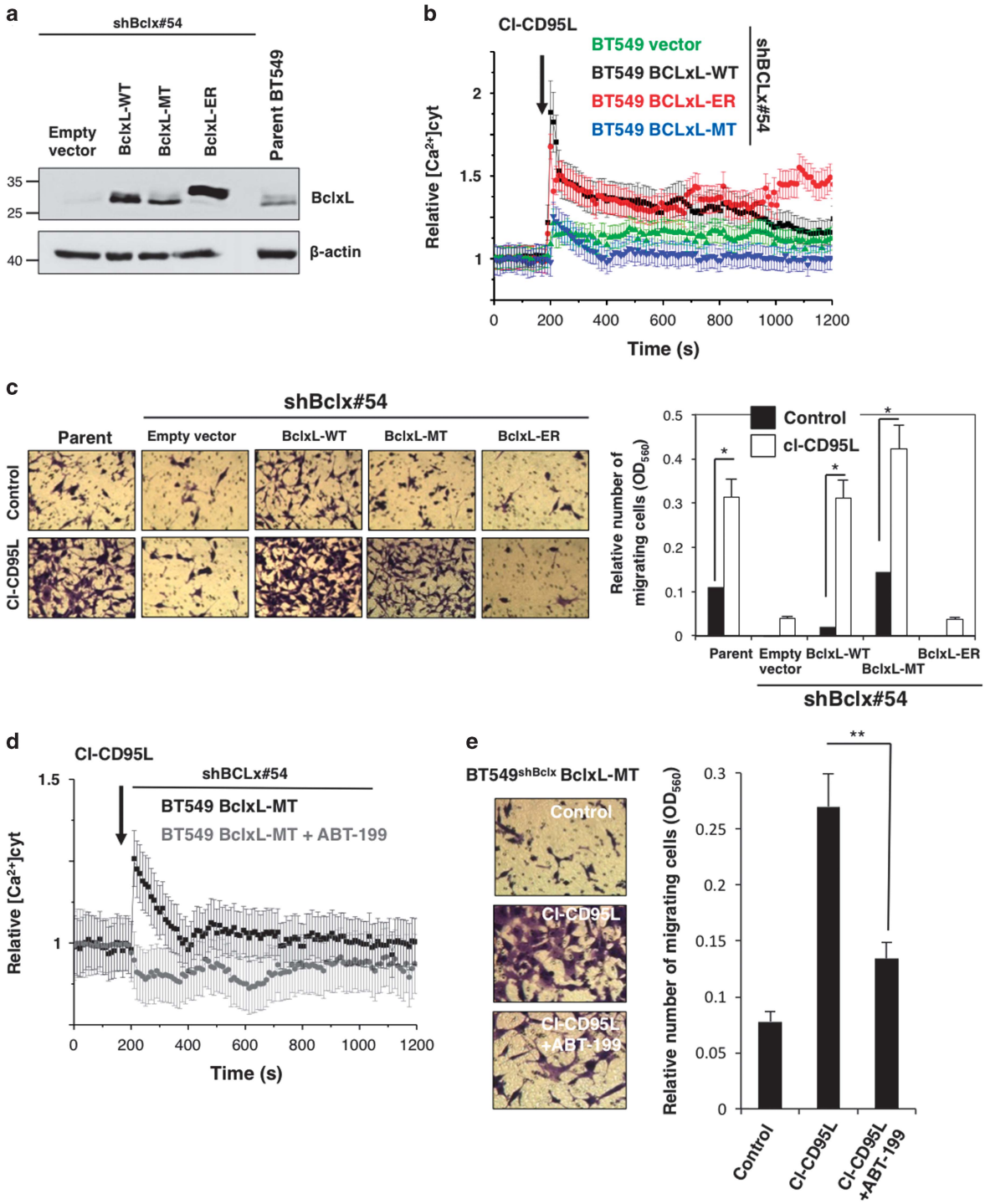


Figure 4 Localization of BclxL in the outer mitochondrial membrane is pivotal to induce CD95-mediated cell migration. (**a**) BT549 cells infected with a shRNA targeting the Bclx 3′ untranslated region (ShBclx#54) were reconstituted with BclxL-WT, BclxL-ER, or BclxL-MT devoid of the 3′ untranslated region. Cells were lysed and the expression levels of the indicated proteins were evaluated by immunoblotting. (**b**) Cells in (**a**) were loaded with the Ca^{2+} probe Fluo2 and stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml). $[Ca^{2+}]_i$ was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}_{[CYT]}$). Data represent the mean ± s.e. of the mean of F/F_0 in GFP-positive cells ($n > 50$ cells, at least three independent experiments). (**c**) Migration of cells depicted in (**a**) was analyzed by the Boyden chamber assay for 24 h in the presence (100 ng/ml) or absence of cl-CD95L. Migrating cells were stained with Giemsa and lysed. Absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean ± standard deviation of three independently performed experiments (*$P < 0.05$; two-way Mann-Whitney). (**d**) Bclx-deficient BT549 cells ($BT549^{ShBclx}$) reconstituted with BclxL-MT were loaded with the Ca^{2+} probe Fluo2 and pre-incubated for 1 h in the presence or absence of a non-toxic dose of ABT-199 (1 μM). Cells were then stimulated with 100 ng/ml cl-CD95L (black arrow), and $[Ca^{2+}]_i$ was monitored via the ratio F/F_0 (relative $Ca^{2+}_{[CYT]}$). Data represent the mean ± standard error of the mean of F/F_0 in GFP-positive cells ($n > 50$ cells, at least three independent experiments). (**e**) $BT549^{ShBclx}$-BclxL-MT were pre-incubated for 1 h with or without ABT-199 (1 μM) and then treated or untreated with cl-CD95L (100 ng/ml) for 24 h. Cell migration was analyzed using the Boyden chamber assay. Migrating cells were fixed with methanol, stained with Giemsa, and lysed. Absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean ± standard deviation of three independently performed experiments (**$P < 0.01$; two-way Mann-Whitney)

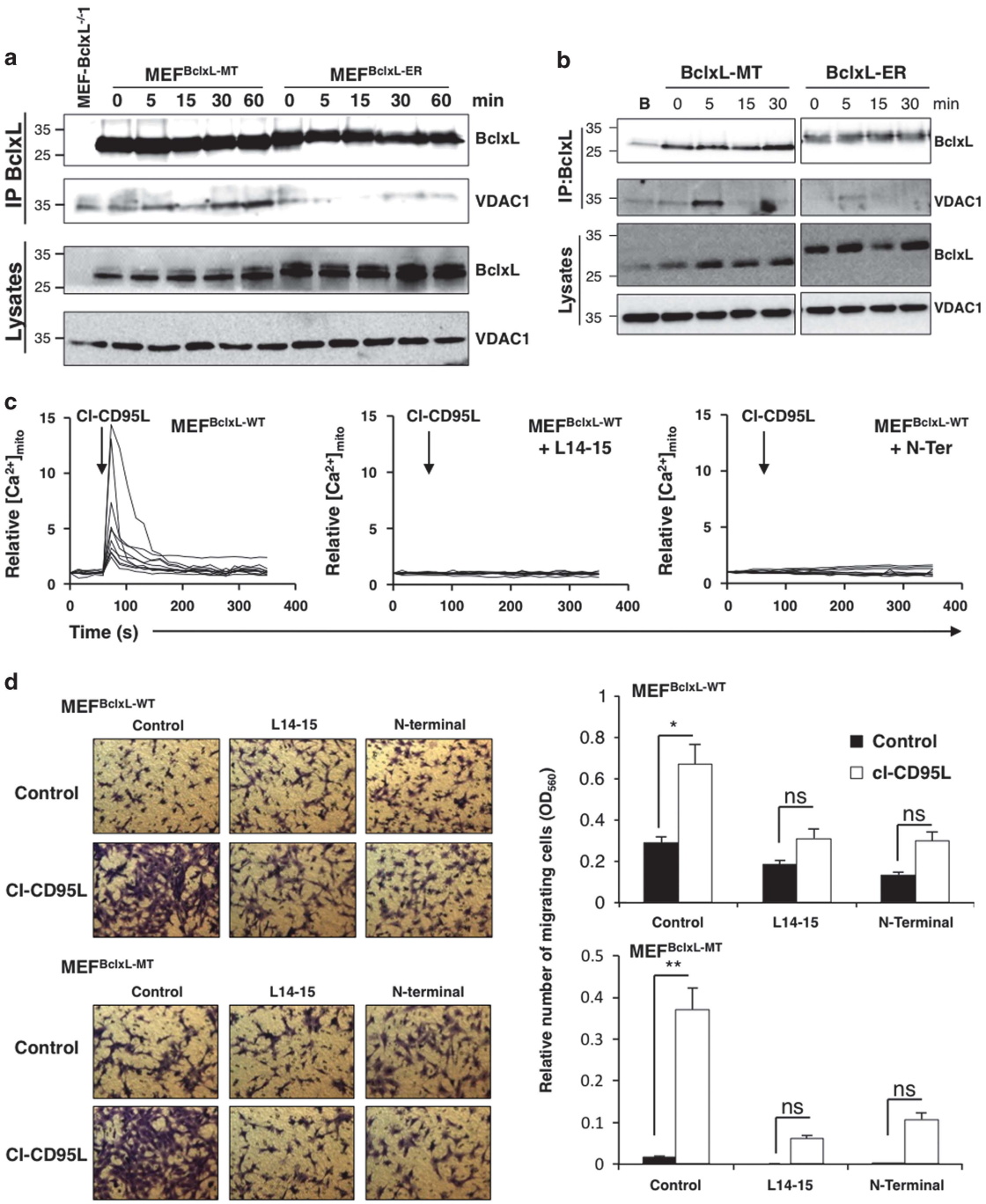


Figure 5 Calcium entry into mitochondria is driven by a BclxL/VDAC1 interaction, which promotes cell motility. (**a**) Bclx-KO MEFs reconstituted with BclxL-MT ($MEF^{BclxL\text{-}MT}$) or BclxL-ER ($MEF^{BclxL\text{-}ER}$) were stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml) for the indicated amount of time. Cells were lysed and BclxL was immunoprecipitated. The immunoprecipitated complex was resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-BclxL and anti-VDAC1 antibodies. $MEF^{BclxL-/-}$ were used as a negative control. (**b**) The experiment in (**a**) was performed with $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with BclxL-MT or BclxL-ER. (**c**) BclxL-deficient MEFs reconstituted with BclxL-WT were loaded with the mitochondrial Ca^{2+} probe (Rhod2) and cell-permeable Mitotracker Green. Representative graphs (10 cells) depicting the relative mitochondrial calcium concentration in control cells (left panel) and L14-15- (middle panel) and N-Ter (right panel)-treated cells (1 μM, 1 h) are shown. (**d**) BclxL-KO MEFs reconstituted with BclxL-WT ($MEF^{BclxL\text{-}WT}$) or BclxL-MT ($MEF^{BclxL\text{-}MT}$) were pre-incubated with the indicated cell-penetrating peptides (1 μM) for 1 h and then stimulated with or without cl-CD95L (100 ng/ml). Cell migration was evaluated by the Boyden chamber assay. Migrating cells were fixed and stained with Giemsa. For each experiment, five images of random fields were acquired. To quantify cell migration, migrating cells were lysed and absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of three independently performed experiments ($^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$; two-way Mann-Whitney)

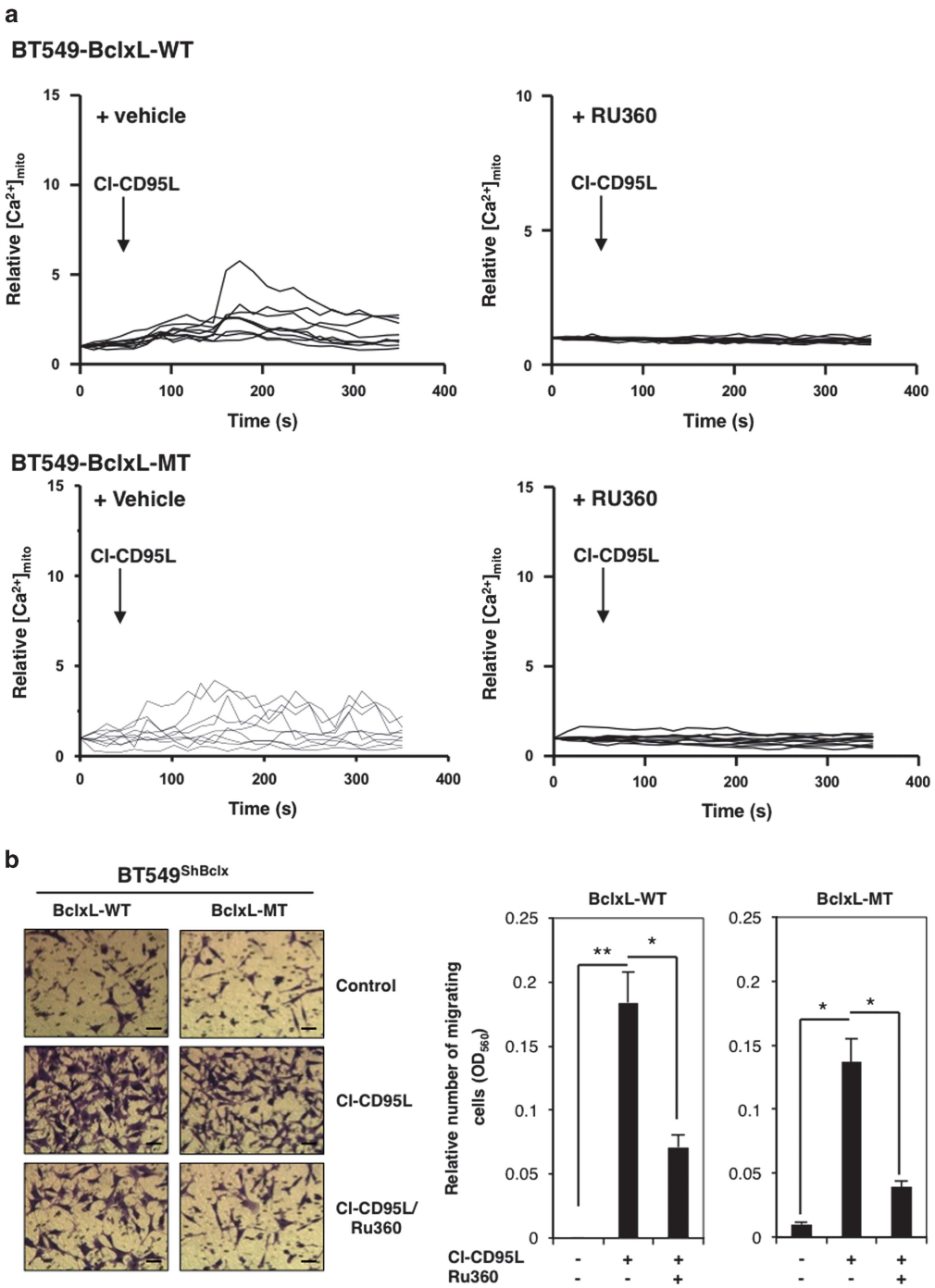


Figure 6 MCU orchestrates Ca^{2+} entry into mitochondria of cells exposed to cl-CD95L. (**a**) $BT549^{ShBclx}$ cells reconstituted with BclxL-WT (BT549-BclxL-WT, *upper panels*) or BclxL-MT (BT549-BclxL-MT, *lower panels*) were loaded with a mitochondrial Ca^{2+} probe (Rhod2, red) and cell-permeable Mitotracker (green) to label mitochondria. Cells were pre-incubated for 1 h with a non-toxic amount of Ru360 (10 μM) and stimulated with cl-CD95L (100 ng/ml). Graphs depict the relative mitochondrial calcium concentrations in the indicated cells pre-treated with vehicle (left panel) or Ru360 (10 μM, right panel). (**b**) $BT549^{ShBclx}$ reconstituted with BclxL-WT and BclxL-MT cells were pre-incubated with Ru360 (10 μM) for 1 h and then stimulated with or without cl-CD95L (100 ng/ml). Cell migration was evaluated by the Boyden chamber assay. Migrating cells were fixed and stained with Giemsa. For each experiment, five images of random fields were acquired. To quantify cell migration, migrating cells were lysed and absorbance was measured at a wavelength of 560 nm. Values represent the mean ± standard deviation of three independently performed experiments (**$P<0.01$, *$P<0.05$; two-way Mann-Whitney)

energy required for cell migration. BclxL-KO MEFs stimulated with cl-CD95L failed to increase ATP production (Supplementary Figure S7A), while reconstitution of these cells with BclxL-WT or BclxL-MT restored the increased ATP production (Supplementary Figure S7A). By contrast, redistribution of BclxL to the ER membrane failed to generate ATP in the presence of cl-CD95L (Supplementary Figure S7A). Of interest, inhibition of the interaction between BclxL and VDAC1 using the L14-15 peptide (Supplementary Figure S7B) or of MCU activity using Ru360 (Supplementary

Figure S7B) abrogated CD95-induced ATP production. This shows that the BclxL/VDAC1/MCU complex in cells stimulated with cl-CD95L orchestrates ATP production necessary for cell migration (Figure 7).

Discussion

This study revealed that the anti-apoptotic members Bcl-2 and BclxL contribute to the migration of TNBC cells exposed to cl-CD95L, recapitulating TNBC women with the poorest prognosis.[15] We provide novel insights into an original molecular mechanism by which BclxL and Bcl-2 cooperate to promote cell migration (Figure 7). Of note, the activity of pyruvate dehydrogenase, an enzyme linking glycolysis to the tricarboxylic acid cycle and ATP production, is positively regulated by Ca^{2+} in the mitochondrial matrix.[40] In this regard, whereas pyruvate dehydrogenase phosphorylation by pyruvate kinase suppresses its activity, its dephosphorylation by Ca^{2+}-dependent pyruvate phosphatase enhances its activity.[41] Therefore, we envision that CD95-mediated mitochondrial Ca^{2+} loading enhances pyruvate phosphatase activity, which in turn activates pyruvate dehydrogenase to promote mitochondrial respiration and ATP production.

Our findings demonstrate that although BclxL expression at the ER membrane restores a cytosolic Ca^{2+} signal, it cannot evoke Ca^{2+} passage from ER stores to the mitochondrial matrix. By contrast, its mitochondrion-restricted isoform promotes this mitochondrial Ca^{2+} uptake but fails to restore the 'wild-type' cytosolic Ca^{2+} signal, indicating that mitochondrion- and ER-localized BclxL contribute to different Ca^{2+} cues and that both distributions are mandatory to evoke a complete Ca^{2+} response in malignant cells exposed to cl-CD95L. Interestingly, the Bcl-2 selective BH3 mimetic ABT-199 abrogated both cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} signals. Because the CD95-mediated Ca^{2+} response is initiated by IP3R-dependent depletion of ER Ca^{2+} stores followed by extracellular Ca^{2+} influx via activation of the plasma membrane channel ORAI1,[12,15,42] these findings suggest that Bcl-2 can control IP3R activity in a BH3-dependent manner (see Figure7). However, this contradicts various studies showing that Bcl-2 and BclxL mainly modulate the release of Ca^{2+} from ER through an interaction of their BH4 domain with IP3R.[43] Nonetheless, it is noteworthy that Bcl-2 and BclxL participate in hubs that modulate various cellular outcomes such as cell survival, proliferation, and metabolism.[44] Most, if not all, studies evaluating Bcl-2- and BclxL-dependent regulation of IP3R focused on its effect in the implementation of the apoptotic signaling pathway.[43] Therefore, we postulate that similar to death receptors that can implement opposite signaling pathways according to the cellular context (normal *versus* transformed cells[13,14,45,46]) or the ligand with which they interact (soluble *versus* transmembrane[11,12,15]), IP3Rs are involved in different molecular complexes, which might be regulated in a different manner by Bcl-2 family members.

Our data also provide insight into how loss of BclxL in the ER membrane impairs the CD95-mediated cytosolic Ca^{2+} response, showing that even if Bcl-2 participates in Ca^{2+} release from ER stores, its presence is not sufficient to evoke a 'wild-type' cytosolic Ca^{2+} response. To explain why there is no redundancy among the Bcl-2 family in the cl-CD95L-mediated Ca^{2+} signal, we envision that Bcl-2 and BclxL coordinate the efficient release of Ca^{2+} from the ER by acting on different partners in a large IP3R(s) complex or by modulating the activity of different IP3R isoforms necessary for transmitting a complete Ca^{2+} response. Our study also reveals the complex interplay between these two Bcl-2 members in the regulation of Ca^{2+} flux from the ER to the mitochondrial matrix.

Of note, high-calcium microdomains are observed in the lamella of migrating cells and are involved in guiding cells.[47] Accordingly, Ca^{2+} buffering by mitochondria and its control by Bcl-2 and BclxL may be essential to steer cells across a cl-CD95L gradient in TNBC tissues.

IP3R can be phosphorylated by Akt, resulting in reduced Ca^{2+} efflux from the ER and less apoptosis.[48] Of note, whereas the BH3 mimetic ABT-737 did not affect CD95-mediated Akt phosphorylation (Figure 1b), silencing of BclxL or Bcl-2 enhanced Akt activation (Supplementary Figure S1F), indicating that Bcl-2/BclxL-driven PI3K/Akt regulation occurs through a BH3-independent mechanism, which remains to be identified. However, our data led us to hypothesize that by reducing the intensity of PI3K/Akt signaling induced by cl-CD95L in TNBC cells, BclxL and Bcl-2 may enhance IP3R activity and thereby promote Ca^{2+} flux from the ER to mitochondria to produce more ATP, fueling cell migration.

A phase II clinical trial demonstrated that a decoy CD95 receptor, APG101, can impede the CD95/CD95L interaction in humans suffering from glioblastoma and allow partial response in these patients.[49] Although APG101 may represent a short-term therapeutic approach for TNBC patients, its inability to discriminate between the anti-tumor/infectious (i.e., apoptotic signaling) and the pro-inflammatory actions of CD95 may engender, if used in a chronic manner, unexpected adverse events such as infection and tumor relapse.

Overall, this study highlights that the classical 'apoptotic machinery' is instrumental in cell migration. Therefore, tumor cells are not only selected according to their ability to resist apoptotic signaling pathways but also their capacity to use this 'apoptotic machinery' in order to become more aggressive and thus metastatic. Navitoclax, also designated ABT-263, is an orally bioavailable derivative of ABT-737[50] that unfortunately showed side effects such as thrombocytopenia in phase II clinical trials.[51] Our results indicate that a combination of low doses of navitoclax with classical chemotherapy applied in TNBC women is an attractive therapeutic option not only to reduce the risk of metastatic dissemination in patients with a high serum concentration of CD95L but also to decrease the side effects observed when this drug is used at cytotoxic doses.[52]

Materials and Methods

Cell lines and shRNAmir lentiviral transduction. BclxL-KO MEF cells were described earlier[53] and BAD-KO MEF cells were from Dr P Juin (Nantes, France). BAX/BAK double KO MEF cells were kindly provided by Dr D Arnoult (Villejuif, France). TNBC cell lines, MDA-MB-231 and BT549, and MEF cell lines, Bcl-2 KO and BID KO, were obtained from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France). All cells were cultured in DMEM supplemented with 8% v/v heat-inactivated FCS and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a 5% CO2 incubator. Silencing experiments were performed using lentiviral vector encoding shRNA targeting Bclx (RHS4430-101108659; RHS4430-99157776; RHS4430-99890586; RHS4430-99883769; RHS4430-99881577), Bcl-2 (RHS4430-98901868; RHS4430-98851633; RHS4430-101159334)

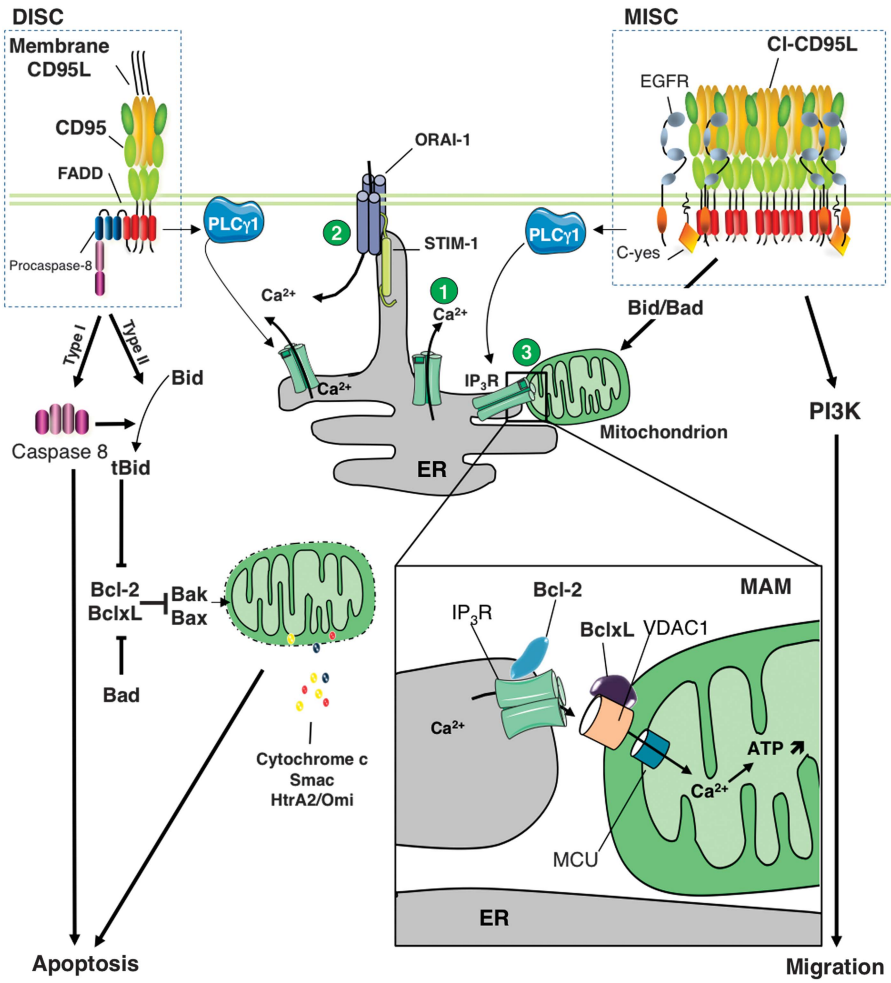


Figure 7 CD95-mediated cell migration occurs through a Bcl-2/BclxL/VDAC1/MCU-driven mitochondrial calcium loading. Death-inducing signaling complex (DISC) and motility-inducing signaling complex (MISC) are formed through protein–protein interaction. For the CD95-mediated apoptotic signaling pathway, type II cells (e.g., hepatocytes) rely on the release of apoptotic factors (i.e., cytochrome c, smac/Diablo, Omi/Hrt2A) by the mitochondria to implement the apoptotic cue while Type I (e.g., T lymphocytes) does not. The CD95-mediated calcium response is initiated by PLCγ1 activation leading to release of the ER-stored Ca^{2+} in the cytosol (1), followed by a store-operated calcium entry (SOCE) through activation of the Ca^{2+} channel Orai1 (2). This study shows the pivotal role played by the calcium transfer from ER to mitochondria (3) in TNBC cell migration induced by cl-CD95L

or a scrambled shRNAmir (negative control) (OpenBiosystems, Waltham, MA, USA). Then, cells stably expressing shRNA were selected for 7 days using 0.5 μg/ml of puromycin. To reconstitute Bclx-silenced BT549 cells with our BclxL constructs, shRNA-BclxL-expressing cells were transfected by electroporation with pcDNA3 vector encoding BclxL-WT, BclxL-Acta (MT) or BclxL-CytB5 (ER) or empty vector. Twenty-four hours after transfection, cells were placed in a medium supplemented with 0.6 mg/ml of neomycin. Neomycin-resistant colonies were isolated using cloning cylinders (Bellco Glass, Vineland, NJ, USA).

Antibodies, plasmids, and reagents. ABT-737 and ABT-199 were obtained from Selleckchem (Houston, TX, USA). Anti-β-actin was purchased from Sigma (L'Isle-d'Abeau-Chesnes, France). Anti-BclxL, anti-Bcl-2, anti-Akt, anti-phosphoS473 Akt, anti-phosphoThr308 Akt, and anti-BAD were from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Anti-BID mAb was from Millipore (Molsheim, France). Anti-BclxL (clone E18) and anti-VDAC1 (ab14734) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-CD95 (C20), anti-VDAC1, and Ru360 were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Duolink kits (DUO92102) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

N-terminal peptide (LGKSARDVFTKGYGFG) and L14-15 peptide (LAWTAGNSNTR) (VDAC1 sequences) were synthesized by SynPeptide (Shanghai, China). These peptides were coupled with the cell-permeant sequence of antennapedia homeodomain (RQIKIWFQNRRMKWKK) to their C-terminal domain. lgCD95L and metalloprotease-cleaved CD95L were generated in the laboratory.[12] FuraPE3 and Fluo2-AM were from Euromedex (Souffelweyersheim, France); mitotracker green and Rhod2-AM were from Life Technologies SAS (Saint Aubin, France); and BAPTA-AM from Sigma.

GFP sequence lacking stop codon was amplified by PCR from pEGFPN1 sequence using primer pair: sense CGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG CTG and antisense CCGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG. The amplicons was digested by *Xho*1 and *Bam*H1 and inserted into *Xho*1 and *Bam*H1-cleaved pcDNA3.1(+). Next, pcDNA3.1(+)-GFP was linearized using *Xho*I/*Xba*I and sequences corresponding to amino acid residues 107–142 of human CytB5 (ITTIDSSSSWWTNWVIPAISAVAVALMYRLYMAED) or residues 613–639 of Acta ('Actin Assembly inducing protein') (LILAMLAIGVFSLGAFIKIIQLRKNN) synthesized by Sigma-Aldrich were inserted in frame with the GFP sequence.

BclxL (amino acid residues 1–209) lacking transmembrane region weas amplified by PCR using pCMV-BclxL (Origene, Rockville, MD, USA) as a template with the following primer pair: (BCLx sense) 5′ CCCAAGCTTATGTCTCAGAGCAACCG GGAGC 3′, (BCLx antisense) 5′ CCCTCGAGGCGTTCCTGGCCCTTTCGGC 3′. Amplicon was digested by *Hind*III/*Xho*I and inserted into *Hind*III/*Xho*I-digested pCDNA3.1(+)-GFP-Acta or pCDNA3.1(+)-GFP-CytB5 vectors to generate pcDNA3.1 (+)-BclxL-Acta (BclxL-MT), pcDNA3.1(+)-BclxL-CytB5 (BclxL-ER) constructs. All constructs were validated by sequencing (GATC Biotech, Mulhouse, France).

Immunoblot analysis. Cells were lysed for 30 min at 4 °C in lysis buffer (25 mM HEPES (pH 7.4), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, and 2 mM EGTA supplemented with a mix of protease and phosphatase inhibitors (Sigma)). Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for 30 min with TBST (50 mM Tris, 160 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.8) containing 5% w/v dried skimmed milk or 5% BSA and then incubated overnight with primary antibody at 4 °C. The membrane was washed (TBST) and secondary HRP-labeled antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) was added for 1 h. The proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence substrate kit (Pierce).

Immunoprecipitation. $MEF^{BclxL\text{-}MT}$ and $MEF^{BclxL\text{-}ER}$ cells or $BT\text{-}549^{shBclx}$-BclxL-MT and $BT\text{-}549^{shBclx}$-BclxL-ER (10^7 cells) were stimulated with cl-CD95L for the indicated times and then lysed. Lysate was incubated for 1 h at 4 °C with 1 μg of anti-BclxL mAb (clone E18) and BclxL was immunoprecipitated using proteins A/G-conjugated magnetic beads (Ademtech, Pessac, France). After extensive washing, the immune complex was resolved by SDS-PAGE and immunoblotting were performed.

Measure of cell death. Cell death was assessed using viability MTT assay as described previously.[54]

Calcium monitoring. Single-cell cytosolic calcium imaging was performed ratiometrically, using FuraPE3-AM calcium dye, as described previously.[16] Coverslips were mounted in a recording chamber positioned on the stage of an inverted epifluorescence microscope (IX70, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with an × 40 UApo/340-1.15 W objective. Cells were loaded with 5 μM FuraPE3-AM at room temperature in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) for 30 min. FuraPE3-AM exhibits limited compartmentalization in intracellular stores and is leakage-resistant.[55] The cells were rinsed with HBSS and incubated in the absence of the Ca^{2+} probe for 15 min to complete de-esterification of the dye. Fluorescence micrograph images were captured at 510 nm and at 12-bit resolution by a fast-scan camera (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrics, Tucson, AZ, US). FuraPE3-AM was excited at 340 and 380 nm alternately and the ratios of the resulting images were produced at constant 10-s intervals. Regions of interest were drawn on certain recorded cells to restrict data collection to specific regions. Imaging was controlled by Universal Imaging software, including Metafluor and Metamorph. Data were processed using OriginPro 7.5 software (Origin Lab, Northampton, MA, USA).

For experiments on GFP-expressing cell lines, Fluo2-AM was used, because GFP fluorescence disturbs Ca^{2+} measurement with FuraPE3. ShRNA-transduced cells (GFP expressing cells) were located by their emission of fluorescence at 530 nm for a light excitation at 485 nm. Ca^{2+} changes were evaluated by exciting Fluo2-AM-loaded cells at 535nm. The values of the emitted fluorescence (605 nm) for each cell (F) were normalized to the starting fluorescence (F_0) and reported as F/F_0 (relative $Ca^{2+}{}_{[CYT]}$). Only GFP-positive cells were considered. Cells were loaded with Fluo2-AM (1 μM) for 30 min and then incubated for 15 min in HBSS to complete de-esterification of the dye.

Single-cell mitochondrial calcium imaging was performed on Rhod2, and mitotracker-loaded cells. Cells were loaded with 3 μM Rhod2-AM and mitotracker green at room temperature in HBSS for 120 min. Mitotracker green and Rhod2 were alternately excited using the 488- and 568-nm lines, respectively, of a krypton-argon laser. Emitted fluorescence was acquired using a Zeiss LSM 510 meta confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with an ApoPLAN × 63 objective. The emitted fluorescence was filtered using a dual bandpass filter set and collected and analyzed using Zeiss software. In some experiments, cells were placed in a Ca^{2+}-free medium (HBSS in which $CaCl_2$ was omitted and 100 μM EGTA). This medium was added to the cells just before recording to avoid leak of the intracellular calcium stores. Data from ~ 30 cells were acquired per field. One field was acquired from each coverslip and the data pooled from six independent coverslips on three different days. Fluorescence intensity changes were normalized to the initial fluorescence value F_0 and expressed as F/F_0. Data were summarized as mean +/− S.E.M.

Proximity ligation assay. BclxL-deficient BT549 cells reconstituted with BclxL-WT, BclxL-MT, and BclxL-ER were let adhere to coverslip for 24 h. Then, cells were stimulated with or without cl-CD95L (100 ng/ml) for 15 min. After extensive washes with PBS, cells were fixed and permeabilized with ethanol (70%) for 20 min at − 20 °C. Cells were blocked with PBS-5% FCS for 20 min at RT, then incubated for 20 min at 4 °C with a mix of primary antibody consisting of anti-VDAC1 (ab14734) and anti-BclxL (clone E18) diluted to 1:500 in PBS-5% FCS. Following steps were realized according to the manufacturer recommendations.

Motility assays. After membrane hydration of Boyden chambers (Millipore) containing 8 μm pore membranes, 10^5 cells were added to the top chamber. The bottom chamber was filled with low serum (1%)-containing medium in the presence or absence of cl-CD95L (100 ng/ml). After 24 h, cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. Stained cells were then removed from the top side of the membrane using a cotton-tipped swab and five representative pictures were taken of cells that have migrated to the membrane reverse side. For each experiment, invading cells were lysed and absorbance at 560 nm was measured.

Intracellular ATP measurement. Mitochondrial ATP levels were measured by transfecting MEF cells with the mitochondrion-targeted FRET-based probe (Mito-ATEAM), as previously described.[56] Briefly, cells seeded on coverslips were washed in a modified Ringer's medium (in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl2, 2 CaCl2, 10 HEPES, and 10 glucose at pH 7.3) and images were collected using 440 nm excitation and alternate 475/535 nm emission on an Axiovert S100 TV microscope through a × 40, 1.3 NA oil-immersion objective (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 16-bit CCD camera, Xenon lamp and filter-based wavelength switcher (Visitron Systems, Puchheim, Germany). Relative changes in mitochondrial ATP are reported as background-subtracted FRET.

Statistical analysis. Two-tailed Mann–Whitney non-parametrical tests were used for comparison of means.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are grateful to Dr R Castellano and Dr Y Collette (TrGET and CRCM animal facilities, Université de la Méditerranée, Marseille). We thank Drs. H Imamura and H Noji for providing the ATeam probes. This work was supported by INCa PLBIO, Ligue Contre le Cancer (Comités d'Ille-et-Vilaine/du Morbihan/des Côtes d'Armor/du Maine et Loire et des Pyrénées Atlantiques), Fondation ARC, Région Bretagne, Rennes Métropole. Biotrial and ANR LabCom. LC was supported by NIH grants (CA106599, CA175003, and GM106386).

1. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; **8**: 705–711.
2. Monaco G, Vervliet T, Akl H, Bultynck G. The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP3Rs and beyond. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**: 1171–1183.
3. Du YC, Lewis BC, Hanahan D, Varmus H. Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. *PLoS Biol* 2007; **5**: e276.
4. Hager JH, Ulanet DB, Hennighausen L, Hanahan D. Genetic ablation of Bcl-x attenuates invasiveness without affecting apoptosis or tumor growth in a mouse model of pancreatic neuroendocrine cancer. *PLoS One* 2009; **4**: e4455.
5. Martin SS, Ridgeway AG, Pinkas J, Lu Y, Reginato MJ, Koh EY *et al.* A cytoskeleton-based functional genetic screen identifies Bcl-xL as an enhancer of metastasis, but not primary tumor growth. *Oncogene* 2004; **23**: 4641–4645.
6. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; **81**: 935–946.
7. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; **268**: 1347–1349.
8. Drappa J, Vaishnaw AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1643–1649.
9. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009; **30**: 180–192.
10. Tauzin S, Debure L, Moreau JF, Legembre P. CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**: 1261–1277.
11. O' Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD *et al.* Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 2009; **461**: 659–663.
12. Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Selva E, Khadra N, Daburon S, Contin-Bordes C *et al.* The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol* 2011; **9**: e1001090.

13. Hoogwater FJ, Nijkamp MW, Smakman N, Steller EJ, Emmink BL, Westendorp BF *et al.* Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2357–2367.
14. Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O *et al.* Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 2008; **13**: 235–248.
15. Malleter M, Tauzin S, Bessede A, Castellano R, Goubard A, Godey F *et al.* CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 2013; **73**: 6711–6721.
16. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A *et al.* The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 549–559.
17. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(15 Pt 1): 4429–4434.
18. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2329–2334.
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
20. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; **435**: 677–681.
21. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K *et al.* Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6939–6942.
22. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
23. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
24. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; **53**: 4701–4714.
25. Zhu W, Cowie A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* 1996; **15**: 4130–4141.
26. Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; **19**: 202–208.
27. Gilabert JA, Parekh AB. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *EMBO J* 2000; **19**: 6401–6407.
28. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; **80**: 285–291.
29. Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ *et al.* Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 2008; **14**: 144–153.
30. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; **91**: 231–241.
31. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; **278**: 687–689.
32. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; **94**: 491–501.
33. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; **94**: 481–490.
34. Daburon S, Devaud C, Costet P, Morello A, Garrigue-Antar L, Maillasson M *et al.* Functional characterization of a chimeric soluble Fas ligand polymer with in vivo anti-tumor activity. *PLoS One* 2013; **8**: e54000.
35. Huang H, Hu X, Eno CO, Zhao G, Li C, White C. An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca2+ uptake. *J Biol Chem* 2013; **288**: 19870–19881.
36. Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G *et al.* Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca2+ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 2002; **159**: 613–624.
37. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011; **476**: 336–340.
38. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011; **476**: 341–345.
39. Kwong JQ, Lu X, Correll RN, Schwanekamp JA, Vagnozzi RJ, Sargent MA *et al.* The mitochondrial calcium uniporter selectively matches metabolic output to acute contractile stress in the heart. *Cell Rep* 2015; **12**: 15–22.
40. Cardenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgo J, Muller M *et al.* Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca2+ transfer to mitochondria. *Cell* 2010; **142**: 270–283.
41. Patel MS, Korotchkina LG. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**(Pt 2): 217–222.
42. Khadra N, Bresson-Bepoldin L, Penna A, Chaigne-Delalande B, Segui B, Levade T *et al.* CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca2+ entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) beta2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 19072–19077.
43. Monaco G, Decrock E, Akl H, Ponsaerts R, Vervliet T, Luyten T *et al.* Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca2+ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 295–309.
44. Choe CU, Ehrlich BE. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE* 2006; **2006**: re15.
45. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J* 2004; **23**: 3175–3185.
46. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C *et al.* CD95 promotes tumour growth. *Nature* 2010; **465**: 492–496.
47. Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H. Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 2009; **457**: 901–905.
48. Pinton P, Giorgi C, Pandolfi PP. The role of PML in the control of apoptotic cell fate: a new key player at ER-mitochondria sites. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1450–1456.
49. Tuettenberg J, Seiz M, Debatin KM, Hollburg W, von Staden M, Thiemann M *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of APG101, a CD95-Fc fusion protein, in healthy volunteers and two glioma patients. *Int Immunopharmacol* 2012; **13**: 93–100.
50. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; **68**: 3421–3428.
51. Rudin CM, Hann CL, Garon EB, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi PD, Camidge DR *et al.* Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3163–3169.
52. Schoenwaelder SM, Jackson SP. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics (ABT-737 or ABT-263) and the modulation of cytosolic calcium flux and platelet function. *Blood* 2012; **119**: 1320–1321, author reply 1321-1322.
53. Eno CO, Eckenrode EF, Olberding KE, Zhao G, White C, Li C. Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca2+ homeostasis. *Mol Biol Cell* 2012; **23**: 2605–2618.
54. Chaigne-Delalande B, Mahfouf W, Daburon S, Moreau JF, Legembre P. CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1654–1664.
55. Vorndran C, Minta A, Poenie M. New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. *Biophys J* 1995; **69**: 2112–2124.
56. Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 15651–15656.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (http://www.nature.com/cdd)

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 2), pp: 3181-3196

Research Paper

The antidepressant fluoxetine induces necrosis by energy depletion and mitochondrial calcium overload

Emilie Charles[1,6,*], Mehdi Hammadi[1,6,*], Philippe Kischel[2], Vanessa Delcroix[1,6], Nicolas Demaurex[3], Cyril Castelbou[3], Anne-Marie Vacher[1,6], Anne Devin[4,6], Thomas Ducret[5,6], Paula Nunes[3], Pierre Vacher[1,6]

[1]INSERM U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

[2]Laboratory of Cellular and Molecular Physiology EA4667, Université de Picardie Jules Verne, SFR CAP-SANTE (FED 4231), Amiens, France

[3]Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva, Geneva, Switzerland

[4]Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, Bordeaux, France

[5]INSERM U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, Bordeaux, France

[6]Université de Bordeaux, Bordeaux, France

[*]These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: *Mehdi Hammadi,* ***email:*** *m.hammadi.2802@gmail.com*

Keywords: *fluoxetine, CRAC, calcium overload, respiratory chain, cell death*

Received: *October 19, 2016* ***Accepted:*** *November 21, 2016* ***Published:*** *November 29, 2016*

ABSTRACT

Selective Serotonin Reuptake Inhibitor antidepressants, such as fluoxetine (Prozac), have been shown to induce cell death in cancer cells, paving the way for their potential use as cancer therapy. These compounds are able to increase cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), but the involved mechanisms and their physiological consequences are still not well understood. Here, we show that fluoxetine induces an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ by emptying the endoplasmic reticulum (ER) through the translocon, an ER Ca^{2+} leakage structure. Our data also show that fluoxetine inhibits oxygen consumption and lowers mitochondrial ATP. This latter is essential for Ca^{2+} reuptake into the ER, and we postulated therefore that the fluoxetine-induced decrease in mitochondrial ATP production results in the emptying of the ER, leading to capacitative calcium entry. Furthermore, Ca^{2+} quickly accumulated in the mitochondria, leading to mitochondrial Ca^{2+} overload and cell death. We found that fluoxetine could induce an early necrosis in human peripheral blood lymphocytes and Jurkat cells, and could also induce late apoptosis, especially in the tumor cell line. These results shed light on fluoxetine-induced cell death and its potential use in cancer treatment.

INTRODUCTION

The antidepressant fluoxetine belongs to the Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor (SSRI) family. SSRIs enable an increase in serotonin concentration in the synaptic cleft by preventing serotonin re-uptake back into the excitatory neuron [1]. SSRIs are effective antidepressants that possess an advantageous safety profile, especially concerning overdose. In most countries, fluoxetine (Prozac®) was the first SSRI that became available for clinical use [2]. Since then, fluoxetine has become one of the most widely used antidepressants.

In addition to their neurological effects, SSRIs – and especially fluoxetine – display toxic properties towards cancer cells, which are dissociated from their selective inhibition of serotonin reuptake. Indeed, fluoxetine has been shown to induce cell death in cancer cells *in vitro* [3–11] and to prevent the growth of tumors *in vivo* [5, 12–14]. Fluoxetine reduces cell viability in various models of cancer. Moreover, fluoxetine does not decrease the viability of non-cancer cell lines such as HSF [4] or primary cells such as peripheral blood mononuclear cells and B lymphocytes [9], suggesting that fluoxetine selectively kills tumor cells. Several types of cell death seem to be involved, with various publications reporting not only apoptosis [7–10], but also autophagy [10]. However, the precise mechanisms involved in fluoxetine-induced cell death remain largely unresolved at this time.

Fluoxetine and SSRIs also have reported effects on cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) and on ion channels, which can be either activated or inhibited. For example, numerous experiments have shown that fluoxetine induces an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in immune cells [9, 10, 15–17] and central nervous system cells [18, 19]. This effect is found both in healthy and cancer cell models. Reports that fluoxetine induces Ca^{2+} release from the Endoplasmic Reticulum (ER) and mimics B-cell receptor (BCR) ligation [9, 20] suggest that the pathway could involve PhosphoLipase C (PLC) activation, leading to the production of Inositol 1,4,5-trisPhosphate (IP_3) and to the activation of the IP_3 Receptors (IP_3R) located within the ER membrane. However, other authors have shown that IP_3 is on the contrary not involved in fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ [16, 17, 20]. Nevertheless, whether IP_3R is involved or not, Ca^{2+} is released from an intracellular compartment after a fluoxetine treatment [20]. It appears that the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induced by fluoxetine is due to a Ca^{2+} entry [10, 15–17, 20]. Ca^{2+} is a second messenger, which is of utmost importance for numerous cellular processes including cell death. Hence, Ca^{2+} homeostasis is crucial, and it is well known that Ca^{2+} overload or an alteration in Ca^{2+} levels within different cellular compartments can be cytotoxic and may lead to cell death by necrosis, apoptosis or autophagy [21, 22]. Notably, mitochondria are a central compartment regarding Ca^{2+}-induced cell death, and fluoxetine is found mainly accumulated in this organelle [23]. Overall, further insight is needed in order to elucidate the pathways involved in the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ triggered by fluoxetine.

The purpose of this study was thus to determine the signaling pathway triggered by fluoxetine, leading to a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase in both cancer and healthy immune cells. For cancer cells, both adherent and non-adherent cell models were used. Additionally, we studied the relationship between the Ca^{2+} pathway and the cell death pathway. We confirmed that fluoxetine induces an ER-dependent cytosolic Ca^{2+} increase in adherent and non-adherent cell models. However, our data shows that this cytosolic Ca^{2+} increase is due to a "thapsigargin-like" effect, where Ca^{2+} leaves the ER via the translocon and triggers Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE). The initial calcium leak is produced by a direct or indirect inhibition of SERCA activity, since fluoxetine impairs ATP production by inhibiting the respiratory chain. The rise in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ resulted in a mitochondrial Ca^{2+} overload leading to cell death, mainly by necrosis.

RESULTS

Fluoxetine induces an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration resulting from Ca^{2+} release as well as Ca^{2+} entry

In Jurkat cells, fluoxetine can induce a dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Figure 1A). In order to determine the effects of fluoxetine on $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PBLs cells and the adherent HeLa cancer cell line, we performed dose-response experiments using fluoxetine concentrations ranging between 1 and 100µM, and monitored Fura2-AM fluorescence immediately upon fluoxetine addition. Fluoxetine induces a dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in both PBLs (Figure 1B) and HeLa cells (Figure 1D). Jurkat cells are also shown for comparison under the same experimental settings in Figure 1C.

To determine whether this $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase results from an extracellular influx, from a mobilization of Ca^{2+} from the intracellular stores or both, experiments were carried out in the presence or absence of 2mM Ca^{2+} in the extracellular medium. As shown in Figure 1E for Jurkat cells, the addition of fluoxetine induces a sustained increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in the presence of extracellular Ca^{2+}. In the absence of Ca^{2+}, however, a fluoxetine addition leads to a smaller change in $[Ca^{2+}]_{cyt}$, this increase being transient, returning to the basal level after several minutes. The importance of extracellular Ca^{2+} was confirmed by another experiment in which cells were first placed in a Ca^{2+}-free medium, and Ca^{2+} was perfused after fluoxetine addition (Figure 1F).

Fluoxetine-induced Ca^{2+} entry involves CRAC channels

To determine how extracellular Ca^{2+} is transferred into cells upon fluoxetine treatment, we specifically studied Calcium Release-Activated Ca^{2+} (CRAC) channels, constituted of Orai1, a plasma membrane protein, and STIM1, a calcium sensor located in the ER membrane. When Jurkat cells (Figure 2A and 2B), PBLs (Supplementary Figure S1A and S1B) and HeLa cells (Supplementary Figure S1C and S1D) were pre-treated with BTP2 or ML-9 (inhibiting Orai1 and STIM1, respectively), the addition of fluoxetine in a Ca^{2+}-containing medium led to a transient and highly reduced rise in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (grey traces in Figure 2A, Supplementary Figure S1A and S1C), quite similar to the effects observed in the absence of extracellular Ca^{2+} (red trace in Figure 2A). Furthermore, Jurkat cells expressing shOrai1 exhibited a less intense $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase (Figure 2C and 2D). Similar results were obtained with a non-conducting pore mutant of Orai1 (E106A), acting as a dominant negative (Figure 2E and 2F). These results clearly show that Store-Operated Ca^{2+} (SOC) channels are involved in fluoxetine-induced Ca^{2+} entry.

Fluoxetine-induced Ca^{2+} release is independent of the PLC/IP_3/IP_3R pathway, RyR and of TCP

The involvement of CRAC channels highly suggests that fluoxetine leads to a depletion of intracellular Ca^{2+} stores. In line with this, depletion of ER calcium with thapsigargin (TG) abolished fluoxetine-induced Ca^{2+} signals in HeLa cells (Supplementary Figure S2A). However, when cells were pre-treated with fluoxetine, TG-

induced Ca^{2+} signals were also abolished (Supplementary Figure S2B). Several publications have shown that fluoxetine indeed induces Ca^{2+} release [9, 20], potentially in a PLC and IP_3-independent manner [15, 17, 20]. To more thoroughly characterize the precise ER receptors or pumps responsible for the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase, we used

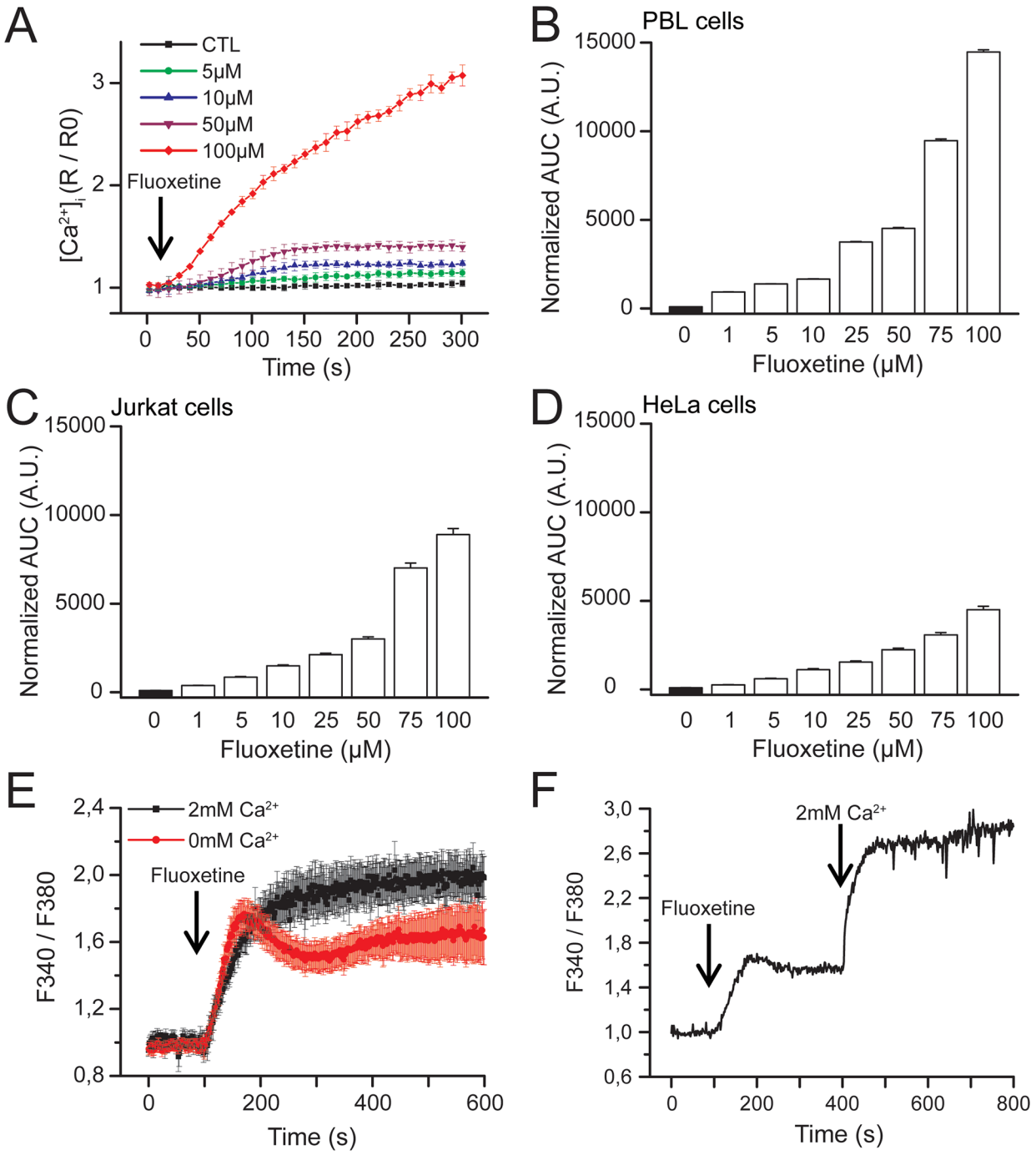


Figure 1: Dose-dependent effects of fluoxetine on $[Ca^{2+}]_{cyt}$. A. Jurkat cells loaded with FuraPE3-AM Ca^{2+} probe were placed in a 2mM Ca^{2+} containing medium. Fluoxetine injection (5 to 100µM) is indicated by the arrow. Ratios were normalized to baseline. Results correspond to 3 independent experiments with 12 averaged wells per experiment. **B, C** and **D.** Quantification of Ca^{2+} responses induced by fluoxetine in a medium containing 2mM Ca^{2+} in PBL cells (B), Jurkat cells (C) and HeLa cells (D). The reported values represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.). **E**. Jurkat cells were loaded with FuraPE3-AM, and fluorescence ratios were recorded in the presence (2mM, black trace) or absence (0mM, red trace) of external Ca^{2+}. **F**. Jurkat cells loaded with Fura2AM were incubated first with fluoxetine (100µM) in a Ca^{2+}-free medium. External Ca^{2+} was only added a few minutes later.

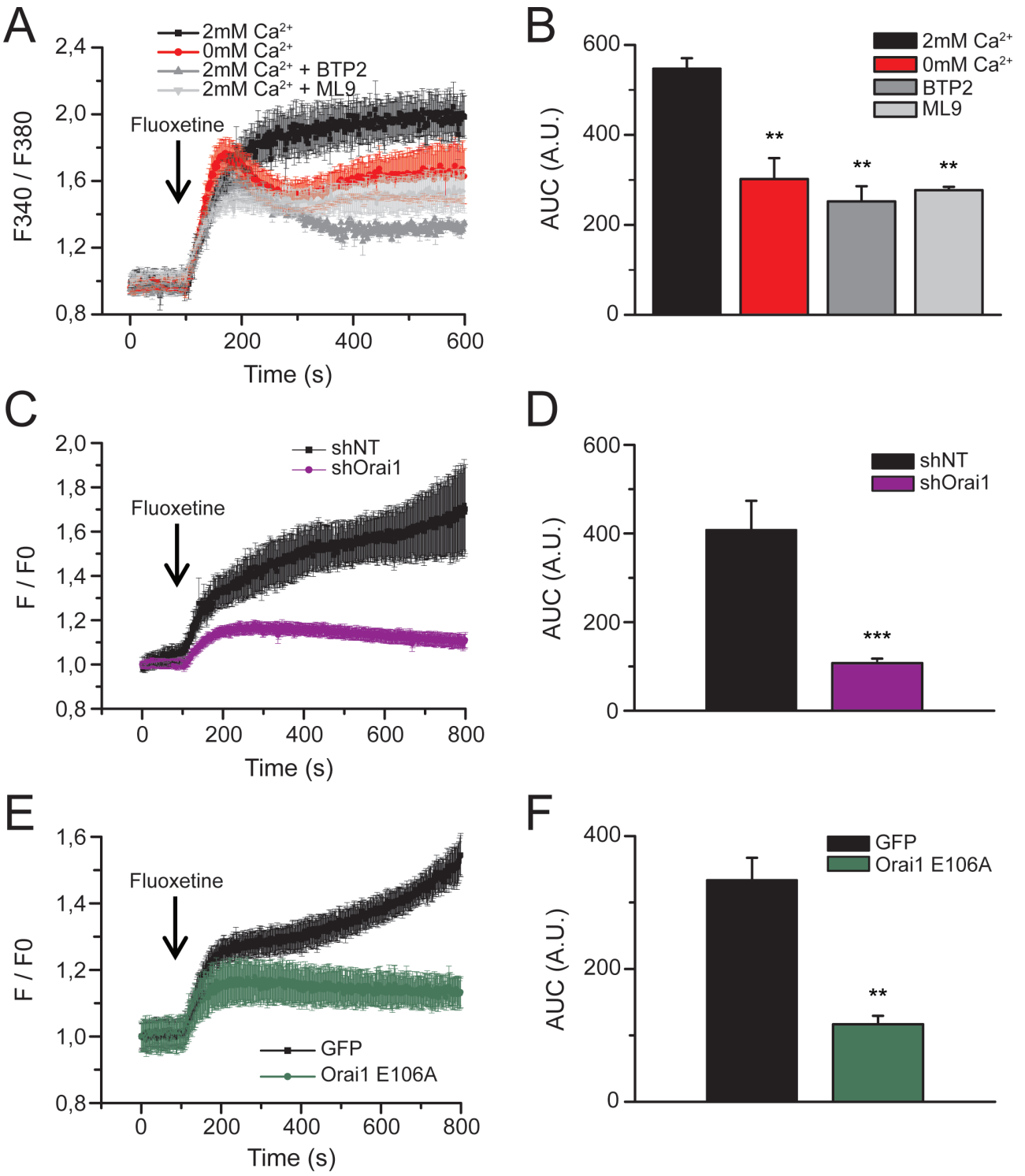


Figure 2: Fluoxetine-induced Ca^{2+} entry involves CRAC channels. A. Jurkat cells were loaded with FuraPE3-AM, and fluorescence ratios were recorded in the presence (2mM, black trace) or in the absence (0mM, red trace) of external Ca^{2+}. Fluoxetine injection (100µM) is indicated by the arrow. Inhibitors of Orai1 channels (BTP2, 10µM, dark grey trace) and Stim proteins (ML9, 10µM, light grey trace) were added in the presence of 2mM Ca^{2+}. **B.** Quantification of results obtained in A: histogram bars represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.), for experiments without external calcium (0mM Ca^{2+}), with external calcium (2mM Ca^{2+}), with BTP2 and with ML9. **C.** and **E.** Fluorescence ratios of Jurkat cells loaded with FuraPE3-AM, either transfected with a non-targeting shRNA (shNT) or a shRNA targeting Orai1 (shOrai1, C), or with a control GFP expression plasmid (GFP) and a plasmid allowing the expression of a non-conducting pore - dominant negative Orai1 (Orai1 E106A, E). Fluoxetine injection (100µM) is indicated by the arrow. **D** and **F.** Quantification of results obtained in C and E, respectively: histogram bars represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.).

various pharmacological inhibitors and modified cell lines. First, we have ruled out the implication of the PLC/IP_3 pathway in our cellular model by monitoring IP_3 localization in cells after the addition of fluoxetine. For this purpose, we used a fusion protein made of the Pleckstrin Homology (PH) domain of PLCδ and eGFP, which is able to bind PIP_2 and IP_3 and hence allows the monitoring of IP_3 localization after PIP_2 cleavage, regardless of the PLC isoform (Figure 3A). As a positive control we used TRAIL, a death ligand able to induce the PLC/IP_3 pathway, leading to an increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. The results show that TRAIL induces relocation of the IP_3 fluorescence from the membrane to the cytosol, revealing PIP_2 cleavage and IP_3 release (Figure 3B). In contrast, fluoxetine does not elicit such a relocation of the fluorescence (Figure 3C). Thus, we conclude that fluoxetine does not activate the PLC/IP_3 pathway in order to trigger the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Using PLCγ1$^{-/-}$ Jurkat cells, we also show that PLCγ1 deficiency does not suppress fluoxetine-induced intracellular Ca^{2+} mobilization (Figure 3D). Moreover, upon treatment with two inhibitors of IP_3Rs (Figure 3E and 3F), namely 2-APB (red trace) and xestospongin C (green trace), no significant difference concerning Ca^{2+} mobilization was revealed upon fluoxetine application. Finally, similar to B cells [20], other experiments using U73122, a pharmacological inhibitor of PLCβ [24], did not reveal significant difference in the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ profile after fluoxetine treatment (Figure 3G and 3H). Together, these results demonstrate that the PLC/IP_3/IP_3R pathway is likely not involved in the fluoxetine-induced calcium release from the ER. Other receptors that could potentially have a role in the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ are the Ryanodine receptors (RyR). Using dantrolene (an inhibitor of RyR1 and RyR3 isoforms), we ruled out the potential implication of these receptors in fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Figure 3G and 3H). Finally, we ensured that Ca^{2+} was not released from lysosomes by using the Two Pore Channel (TPC) inhibitor, Ned19. Cells treated with Ned19 did not show significant modification of the fluoxetine-induced Ca^{2+} increase (Figure 3G and 3H).

Fluoxetine induces ER calcium depletion through the translocon

Since IP_3R and RyR receptors, among others, are not likely to be involved in the ER Ca^{2+} release upon fluoxetine addition, we searched for another candidate. The translocon is an ER structure that enables the transfer of secretory proteins and lumenal domains of membrane proteins from the cytoplasm to the ER lumen [25]. However, it has also been shown that the translocon can mediate a Ca^{2+} leakage from the ER stores into the cytoplasm [26]. To determine whether this mechanism of calcium release could be involved in fluoxetine-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase, we used a pharmacological inhibitor of the translocon, anisomycin (an inhibitor of peptidyl-transferase, leaving the translocon closed [26]). When PBL cells were pretreated 30 minutes with anisomycin, in the absence of extracellular Ca^{2+}, the increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was reduced by 35% after fluoxetine addition in PBLs (Figure 4A and 4B). Interestingly, in Jurkat cells, pre-treatment with anisomycin (30 minutes) reduced the levels of fluoxetine-induced Ca^{2+} release by 85% (Figure 4C and 4D), confirming the role of the translocon in fluoxetine-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ rise.

Fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ leads to calcium accumulation in mitochondria

To decipher the downstream events of the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase after a fluoxetine addition, we took a closer look at the mitochondria, in order to determine if Ca^{2+} could be stored in this compartment. For that purpose, we performed confocal imaging experiments with HeLa cells, using the mitochondrial marker and Ca^{2+} sensing probe Rhod2, in association with the Mitotracker Green mitochondrial probe. The addition of fluoxetine led to an increase in red fluorescence, with the overlap with the Mitotracker Green signal yielding a yellow color, demonstrating the increase in mitochondrial Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_{mt}$, Figure 5A, CTL). For the sake of comparison, we also used TG, a compound that is well known for inhibiting SERCA pumps, raising thus $[Ca^{2+}]_{cyt}$ by ER depletion and Ca^{2+} entry through SOCE (Figure 5A, Tg). Tg induced a larger and faster, but more transient, Ca^{2+} entry in the mitochondria of HeLa cells (Figure 5B). Interestingly, we could not observe any increase in $[Ca^{2+}]_{mt}$ when cells were pretreated with the translocon inhibitor, anisomycin (Figure 5A and 5B). Similar results were obtained on PBLs cells (Figure 5C and 5D), demonstrating that a reduction of only 35% of the fluoxetine-induced cytosolic calcium increase (Figure 4A and 4B) was sufficient to completely abolish the fluoxetine-induced mitochondrial Ca^{2+} increase in these cells (Figure 5D). Next, to identify whether the Ca^{2+} uptake was mediated by the Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter (MCU), we used Ru360, a specific inhibitor of the uniporter. We show that in the presence of Ru360, the fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{mt}$ was abolished in HeLa cells (Figure 5A and 5B), as well as in PBL (Figure 5C and 5D), suggesting the implication of the MCU in the fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{mt}$.

Fluoxetine reduces oxygen consumption and leads to a drop in ATP content

Since our results demonstrate that fluoxetine induces a mitochondrial Ca^{2+} overload, we next sought to determine if fluoxetine exerted other effects on mitochondria, for instance by addressing the potential involvement of the respiratory chain. We thus monitored oxygen consumption rate in different cell lines, and we showed that fluoxetine

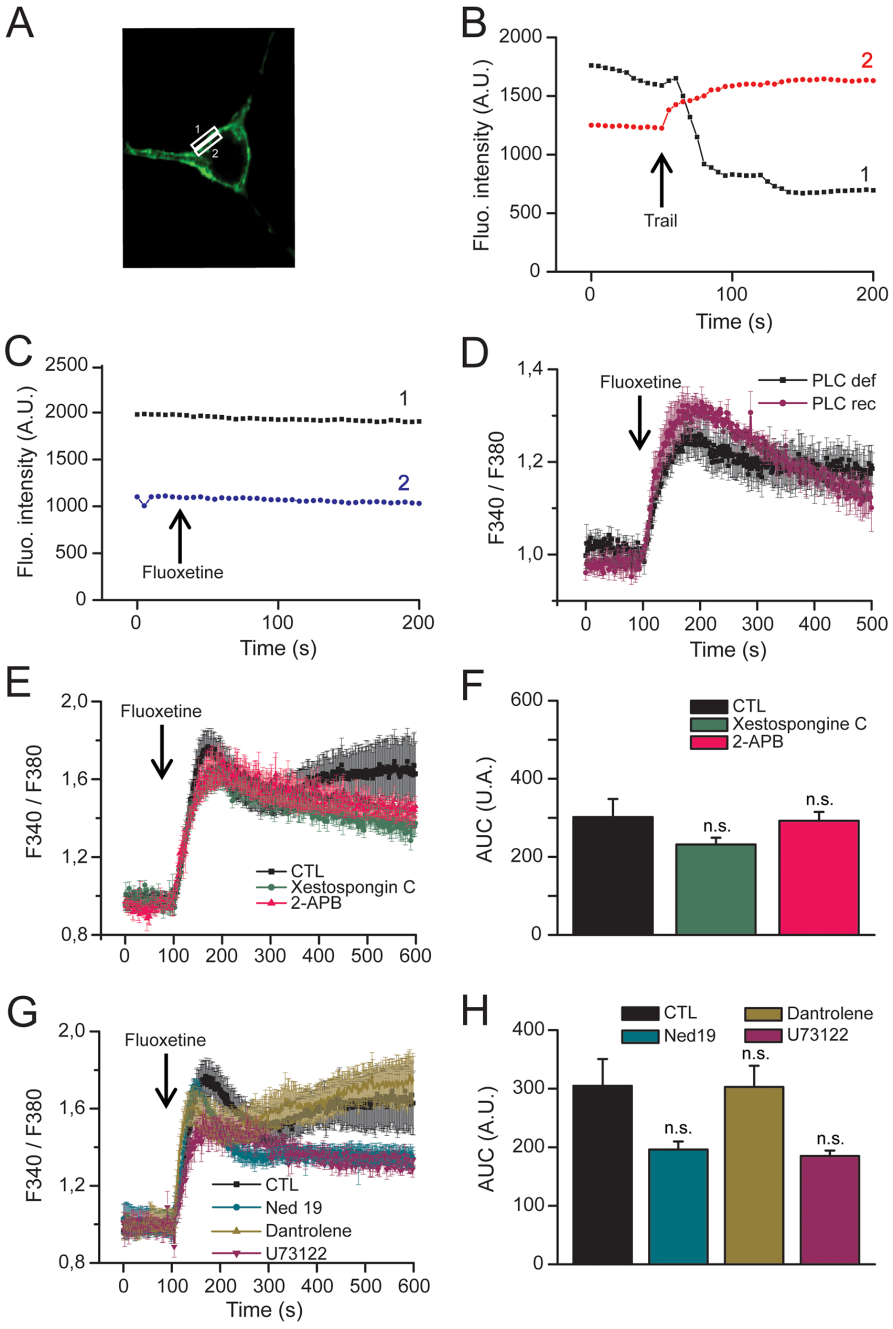


Figure 3: Fluoxetine does not induce hydrolysis of the membrane bound PIP_2. A. Confocal microscopy images of HeLa cells, transfected with a construct enabling transient expression of a fusion protein [Pleckstrin Homology (PH) domain of PLC] / eGFP fluorescent protein, allowing to locate membrane PIP_2, as well as cytosolic IP_3. Fluorescence was measured in zones of interest delimited by rectangles, corresponding to membrane (rectangle "1") and cytosolic regions (rectangle "2"), respectively. **B** and **C.** Time course of fluorescence emission, at the membrane level (black trace) and cytoplasm (red or blue trace): B - To induce IP_3 translocation from membrane to cytoplasm, rhTRAIL (100ng/mL) was injected when indicated by arrow. C - Fluoxetine (100µM) does not induce IP_3 translocation. **D.** Jurkat cells were loaded with FuraPE3-AM Ca^{2+} probe. Cells were either PLCγ deficient (PLC def) or reconstituted with a functional PLCγ (PLC rec). **E.** Jurkat cells were loaded with FuraPE3-AM, and fluorescence ratios were recorded in the presence of 2mM of external Ca^{2+} (black trace). Ratios were also recorded in the presence of the IP_3Rs inhibitors xestospongin C (500nM) and 2-APB (44µM, green and red traces, respectively). **F.** Quantification of results obtained in E: histogram bars represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.), for control (CTL), xestospongin C and 2-APB experiments. **G.** Jurkat cells were loaded with FuraPE3-AM, and fluorescence ratios were recorded in the presence of 10µM dantrolene (inhibitor of RyR1 and RyR3 isoforms, green trace), 10µM U73122 (inhibitor of PLCβ, purple trace) and 5µM Ned19 (TPC inhibitor, blue trace). **H.** Quantification of results obtained in G: histogram bars represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.), for control (CTL), dantrolene, U73122 and Ned19 experiments.

actually inhibits oxygen consumption in PBLs (Figure 6A), as well as in Jurkat cells (Figure 6B), and HeLa cells (Figure 6C), suggesting that fluoxetine inhibits the respiratory chain. When the ATPase activity was stimulated with dinitrophenol (DNP, Figure 6A, B and 6C), fluoxetine was still able to exert an inhibitory effect. Since respiration is coupled to ATP production, we monitored the AMP-activated protein kinase (AMPk) activity by assessing the ratio p-AMPk / AMPk in Jurkat cells treated either with fluoxetine or with AICAR (an activator of AMP kinase). The AMPk system acts as a sensor of cellular energy status, and is activated by increases in the cellular AMP:ATP ratio caused by metabolic stresses that either interfere with ATP production or accelerate ATP consumption [27]. Figure 6D shows that fluoxetine is able to increase the ratio p-AMPk / AMPk, suggesting again that fluoxetine may be able to impair ATP production. We thus monitored ATP production via ATP imaging in single living cells using a Förster resonance energy transfer (FRET) - based fluorescent ATP probe, named ATeam [28]. We found that fluoxetine was able to reproducibly lower the steady-state levels of mitochondrial ATP (Figure 6E and 6F). Although the absolute decrease in ATP content in HeLa cells, which are highly glycolytic cells, was only on the order of 10%, it is noteworthy that this fluoxetine-induced decrease was equal to one third of the decrease observed using the same method with the potent ATP-synthase inhibitor oligomycin (Figure 6E and 6F). Thus, these observations are consistent with a model where fluoxetine partially decreases ATP synthesis by reducing respiratory chain activity. Additionally, we monitored the oligomycin and fluoxetine induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ changes (Figure 6G and 6H). When oligomycin was first added, a general $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase occurred due to ATP synthase inhibition, and fluoxetine was not able to further enhance $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase (Figure 6G). When fluoxetine was first added, the classical $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase occurred, and

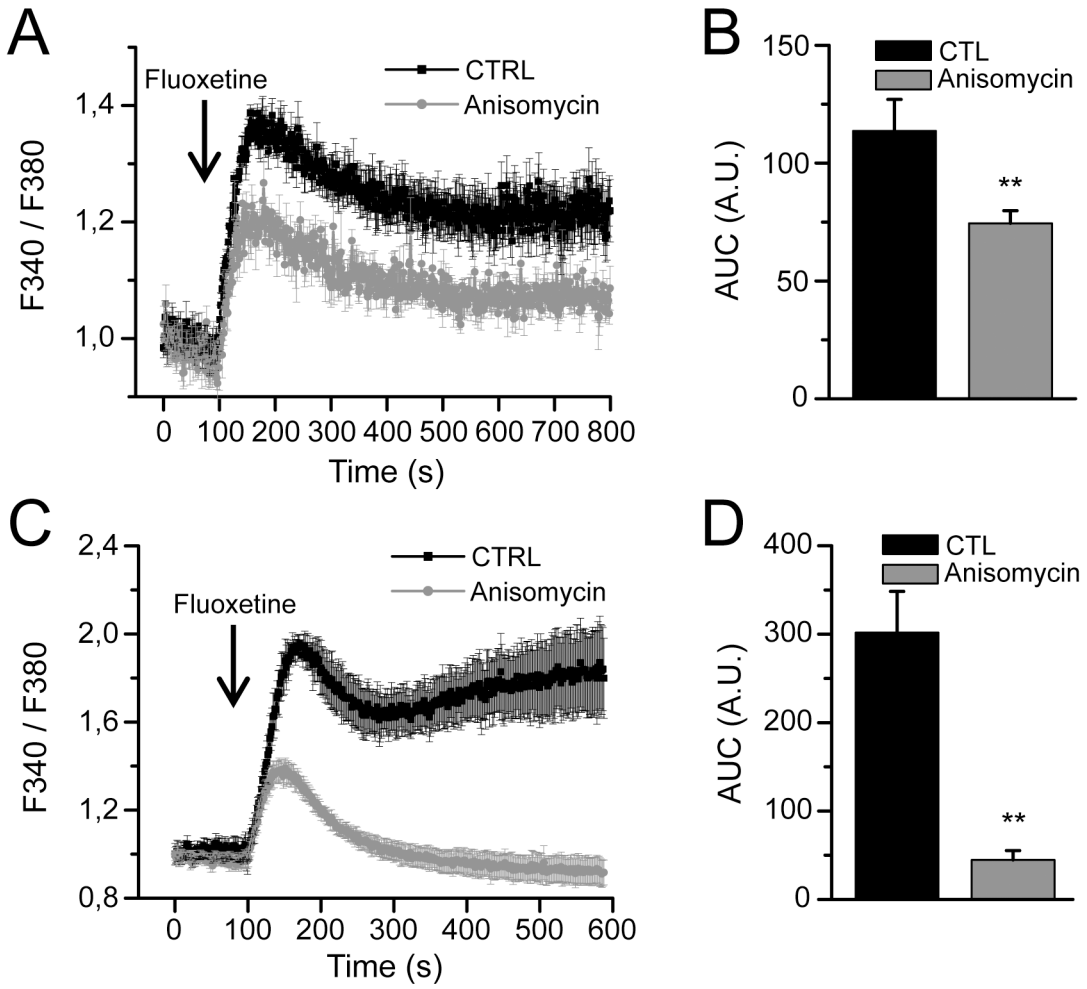


Figure 4: Fluoxetine induces ER Ca^{2+} depletion through the translocon. Measurements of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in PBLs **A.** and in the Jurkat cell line **C.** cells were loaded with FuraPE3-AM, and fluorescence ratios were recorded either in control cells (CTL) or in cells pre-treated with anisomycin (30 min., 50µM), in absence of external Ca^{2+}. **B** and **D.** Quantification of results obtained in A and C, respectively: histogram bars represent the area under the curve (AUC), expressed in arbitrary units (A.U.).

oligomycin was nonetheless able to raise slightly $[Ca^{2+}]_{cyt}$, most probably because of its more potent effect on ATP production (Figure 6H).

Fluoxetine-induced Ca^{2+} signaling leads to late apoptosis and necrosis

We next sought to determine which mechanism was responsible for fluoxetine-induced cell death. Cell death was also induced by i) CD95L, a death ligand known to initiate the death-inducing signaling complex (DISC) upon binding to its receptor, that culminate in the induction of apoptosis [29]; ii) hydrogen peroxide (H_2O_2), one of the most biologically relevant member of the Reactive Oxygen Species (ROS [30]) generated in both intracellular and extracellular space in normal conditions, and also by phagocytic cells at sites of inflammation. High levels of ROS can cause necrosis, while lower levels can cause apoptosis [31]. H_2O_2 was indeed highly effective in inducing necrosis, especially at 24 and 48 hours post-treatment, in PBLs (Figure 7B and 7C) and Jurkat cells (Figure 7E and 7F). The 4h time frame was indeed not

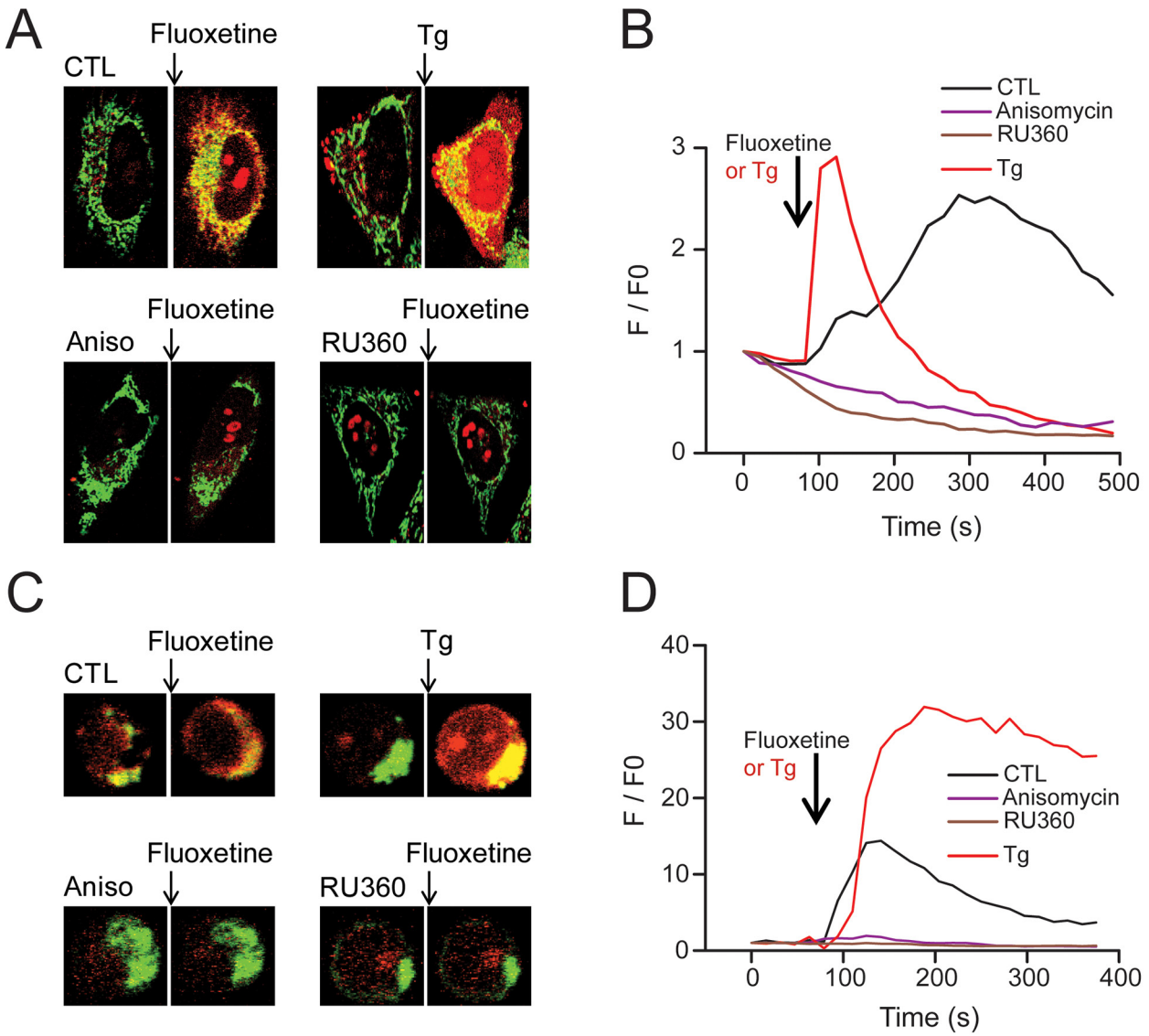


Figure 5: Fluoxetine leads to Ca^{2+} accumulation into mitochondria. A, C. Confocal microscopy images obtained from HeLa cells (A) and PBL cells (C) loaded with the mitochondrial Ca^{2+} probe Rhod2-AM, as well as the mitochondrial probe MitoTracker® green. The increase in mitochondrial Ca^{2+} load induced an increase in the red staining after fluoxetine or TG application, but not after pretreatment with an inhibitor of the translocon (anisomycin, 50μM) or an inhibitor of the MCU (RU360, 10μM). **B.** Rhod-2 fluorescence intensity of representative HeLa cells (as shown in ***A***) over time before and after addition of Tg or fluoxetine (either in control cells or in cells pre-treated with anisomycin or RU360). **D.** Rhod-2 fluorescence intensity of representative PBL cells (as shown in ***C***) over time before and after addition of Tg or fluoxetine (either in control cells or in cells pre-treated with anisomycin or RU360).

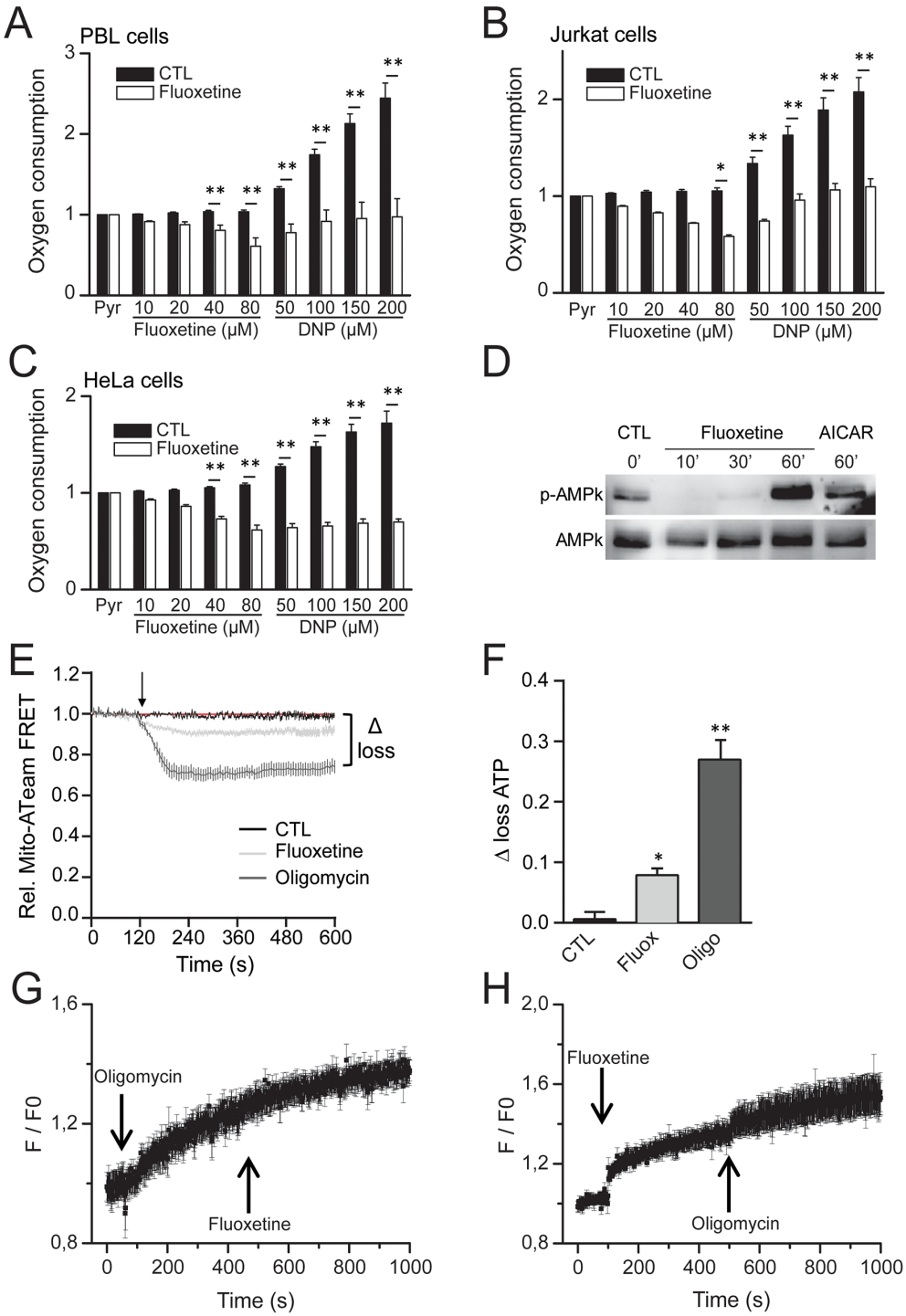


Figure 6: Fluoxetine blocks oxygen consumption and leads to a drop in ATP content. A, B and **C.** Oxygen consumption rates were measured using an Oroboros oxygraph-2k, either without (CTL) or in the presence of fluoxetine or dinitrophenol (DNP, 50 to 200μM), in PBLs (A), Jurkat cells (B) or HeLa cells (C). All values were normalized *vs*. 5mM pyruvate. **D.** Western blotting showing the ratio AMPk / p-AMPk in Jurkat cells in control conditions (CTL, first lane) and in treated conditions, either with fluoxetine (50μM, second, third and fourth lanes, at 10, 30 and 60 minutes post-treatment, respectively) or with AICAR (an activator of AMP kinase, 0.65mM, fifth lane). **E** and **F.** Monitoring of ATP production via ATP imaging in single living cells using a Förster resonance energy transfer (FRET) - based fluorescent ATP probe (ATeam). Loss of ATP is visualized by a decrease in FRET (E), and quantified by the "Δ loss" value. The "Δ loss" values, obtained either with fluoxetine or the ATP synthase inhibitor oligomycin, calculated as the difference between initial and final normalized FRET signals levels after 10 min, are reported in F. **G.** Variations of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induced by fluoxetine (50μM) with oligomycin pre-treatment. **H.** Variations of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ induced by 0.4μM oligomycin with fluoxetine pre-treatment. $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was recorded in a whole cell population. Experiments shown in **G** and **H.** were performed in a Ca^{2+}-free medium.

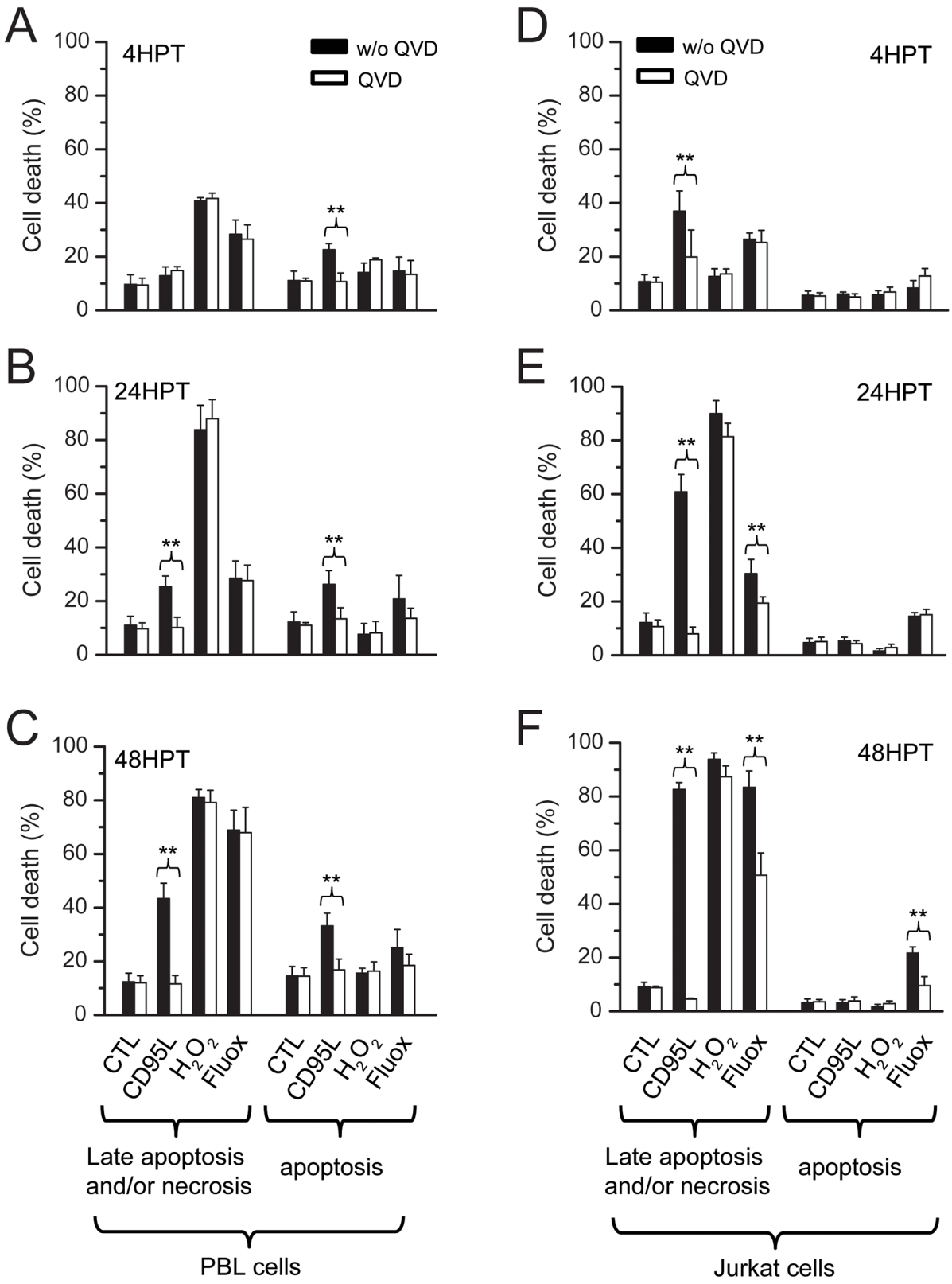


Figure 7: Fluoxetine-induced Ca^{2+} signaling leads to late apoptosis and/or necrosis. Cell death was quantified in PBLs **A**, **B** and **C.** and in Jurkat cells **D**, **E** and **F.** using FACS. Analyses were conducted at 4h post-treatment (A and D), 24h post treatment (B and E) and 48h post treatment (C and F). Cell death was assessed by Annexin V (AV) and Propidium Iodide (PI) staining. Cells were cultured in normal conditions or treated with 20µM QVD, a broad spectrum caspase inhibitor. Cell death was induced with fluoxetine (40µM), but also with CD95L (2.5ng.ml^{-1} for Jurkat cells, 100ng.ml^{-1} for PBLs) and hydrogen peroxide (H_2O_2, 50µM). HPT: hours post-treatment.

enough to see any hydrogen peroxide-induced necrosis on Jurkat cells (Figure 7D), whereas this compound was the most effective in inducing early necrosis in PBLs (Figure 7A). Fluoxetine was quite as effective in inducing necrosis in PBLs, with the largest effect seen at 48h (Figure 7C), and a less pronounced effect at 4h (Figure 7A) and 24h (Figure 7B). Jurkat cells followed apparently the same pattern, but the results were influenced by the application of QVD, a broad spectrum caspase inhibitor [32], suggesting that part of the cells positive for both annexin V (AV^+) and propidium iodide (PI^+) were late apoptotic cells (Figure 7E and 7F). CD95L also induced late apoptosis, especially in Jurkat cells (Figure 7E and 7F), but was less effective in PBLs (Figure 7A, B and 7C). No necrosis was evidenced with CD95L since the QVD inhibitor indeed always abolished detection of AV^+/PI^+ cells. Early apoptosis could also be induced by CD95L in PBLs or by fluoxetine in Jurkat cells, but levels of apoptosis were far lower than necrosis / late apoptotic levels in the same conditions. This apoptosis was efficiently blocked by QVD, (Figure 7A, B, C and 7F). H_2O_2 was clearly not a potent inducer of apoptosis. These results clearly show that late apoptosis and necrosis were the main mechanisms by which cell death occurred, in PBLs and Jurkat cells treated with fluoxetine (especially at 48h). The original Annexin V / PI plots are shown in Supplementary Figure S3.

DISCUSSION

Although it is now widely accepted that SSRIs (such as fluoxetine) are able to induce a rise in intracellular Ca^{2+} and cell death, the exact underlying mechanisms remain obscure. Several groups agreed that fluoxetine releases Ca^{2+} from intracellular stores (including the recent work of Gobin and collaborators in human T lymphocytes [33]), in addition to stimulating extracellular Ca^{2+} entry [9, 20, 34, 35]]. In the present study, we confirm that fluoxetine indeed induces an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration, resulting from an intracellular ER Ca^{2+} release, followed by extracellular Ca^{2+} entry. Since this mechanism is reminiscent of capacitative channel activation, we further assessed the implication of Stim1 and Orai1. We found that these typical actors of store operated Ca^{2+} entry were involved in fluoxetine-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase, in contrast to the recent finding in human T lymphocytes [33]. By using a variety of pharmacological tools and fluorescent assays, we show that the canonical $PLC/IP_3/IP_3R$ pathway is not involved, in good agreement with other studies [15, 17, 20, 34]]. Our results suggest thus that fluoxetine effects are most likely not induced by G protein–coupled receptors signaling, nor through RyR or TPC. We were able to confirm reduced fluoxetine-induced Ca^{2+} signals following pre-treatment with agents depleting ER calcium, such as TG [9, 20] or ATP [34], as shown in Supplementary Figure S2A. However, it is noteworthy that fluoxetine, in turn, was also able to prevent TG from increasing the $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in HeLa cells (Supplementary Figure S2B). This effect is not in agreement with what was found in human bladder cells [20], and the mechanism underlying these cell-type dependent differences remains to be determined. These results led us hypothesize that fluoxetine might have a "TG-like" effect on the ER. Upon TG application, this latter releases ER Ca^{2+} passively through leak channels, including the translocon [36]. In agreement with this hypothesis, the translocon blocker anisomycin either partially or strongly reduced fluoxetine-induced Ca^{2+} signals in PBL and Jurkat cells. How does fluoxetine induce a passive Ca^{2+} leak from the ER? One possibility is that it influences SERCA function, at least indirectly. Of note, the energy used for ER Ca^{2+} reuptake by SERCAs preferentially comes from ATP produced in mitochondria [37]. Since fluoxetine induced a decrease in respiration and a drop in mitochondrial ATP, it is conceivable that this could contribute to an inhibition of the Ca^{2+} reuptake back into the ER. Fluoxetine could be, in this case, considered as an indirect inhibitor of SERCAs. In line with this hypothesis, it has already been shown that the UCP3-mediated uncoupling of oxidative phosphorylation from ATP synthesis can modulate SERCA activity by decreasing mitochondrial ATP production [38].

Previous studies have shown that calcium leaking via the translocon triggers cell death, especially in epithelial cancer cells [39]. Our results demonstrate indeed that the fluoxetine-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$increase involving translocon correlates with cell death in PBLs and Jurkat cells. It is noteworthy that the Jurkat cell line was found to be sensitive to this fluoxetine-induced cell death, contrary to what Gordon's team reported [9]. Unlike TG, that is able to cause cell death mainly by apoptosis (with necrosis being involved to a lesser extent [40]), we found that fluoxetine-induced cell death was mainly caused by necrosis (and / or late apoptosis, especially in Jurkat cells). We hypothesized that these effects could be due to a mitochondrial Ca^{2+} overload, as recently shown in glioma cells [41]. It has already been demonstrated that fluoxetine preferentially accumulates into mitochondria [23], and most importantly, we show that fluoxetine induced Ca^{2+} accumulation into the mitochondria. At lower levels, Ca^{2+} can actually promote ATP synthesis, by stimulating the activity of various metabolic mitochondrial enzymes [42]. However, upon continuous Ca^{2+} overload, two mechanisms are engaged to eliminate Ca^{2+} excess from mitochondria: the NCLX (the mitochondria-specific sodium / calcium exchanger) and / or the PTP (Permeability Transition Pore) [43, 44]. The opening of this latter can cause the inner membrane of the mitochondria to depolarise [45], oxydative phosphorylations to stop (as evidenced herein), matrix swelling and membrane breaks, causing Ca^{2+} as well as proapoptotic molecules (such as cytochrome c) to leak out. Continuous mitochondrial permeability transition can lead to cell death by apoptosis or necrosis, depending on remaining cellular ATP. Intracellular ATP

concentration appear indeed to be a key switch, pointing either to apoptosis or necrosis [46]. If the proportion of damaged mitochondria remains small, but sufficient to activate apoptosis, there will be enough ATP from intact mitochondria for apoptosis to occur [47]. If the proportion of damaged mitochondria is high, it is likely that signals emitted from damaged mitochondria will spread to all mitochondria [48], and subsequent ATP depletion will hinder assembly of the apoptotic machinery, ultimately leading to necrosis [46, 49]. Fluoxetine, at the concentration we used, may therefore induce directly necrosis and/or late apoptosis on most cells, and also apoptosis on a more resistant subpopulation of the cells. All results, as well as the proposed mechanism, are summarized in Figure 8. On the other hand, depletion of ER Ca^{2+} can also lead to ER stress, another pathway able to trigger cell death [50], especially when overstimulation occurs. Whether fluoxetine induces ER stress and whether this contributes to fluoxetine toxicity would require further study.

The cytotoxic fluoxetine effects are highly interesting for potential use in cancer therapies, particularly in light of beneficial psychological effects it may have on patients facing a life-threatening disease. The doses used in the present study to decipher the molecular mechanisms are admittedly high, but in line with most *in vitro* published studies, in which apoptotic effects of fluoxetine are seen from 0.1 to 100µM. Plasma concentrations found in patients treated with fluoxetine are usually in the low micromolar range: plasma concentrations at equilibrium in depressive-treated patients are rather comprised between 0.5 and 1.6µM, with high inter-individual variability [51]. After a 30-days treatment with a 40mg daily intake (neurologic disorders being treated within the 20 to 80mg range), plasma concentrations reach 1µM [52]. This concentration could conceivably retain significant apoptotic effects *in vivo*. Due to the relative safety of fluoxetine, dose escalation would also be an option: a study in which fluoxetine intakes ranged from 280 to 1260mg showed that plasma concentrations could reach 0.75 to 4.5µM (a study of 234 cases with fluoxetine overdose suggest that 1500mg intake is the upper limit [53]). Future investigation on the effects of fluoxetine concentrations within therapeutic range, as well as differential effects between normal and cancer cells (as already suggested by others [4, 9]), will both be necessary to assess whether and how fluoxetine may bring added value to existing cancer treatments in the clinic.

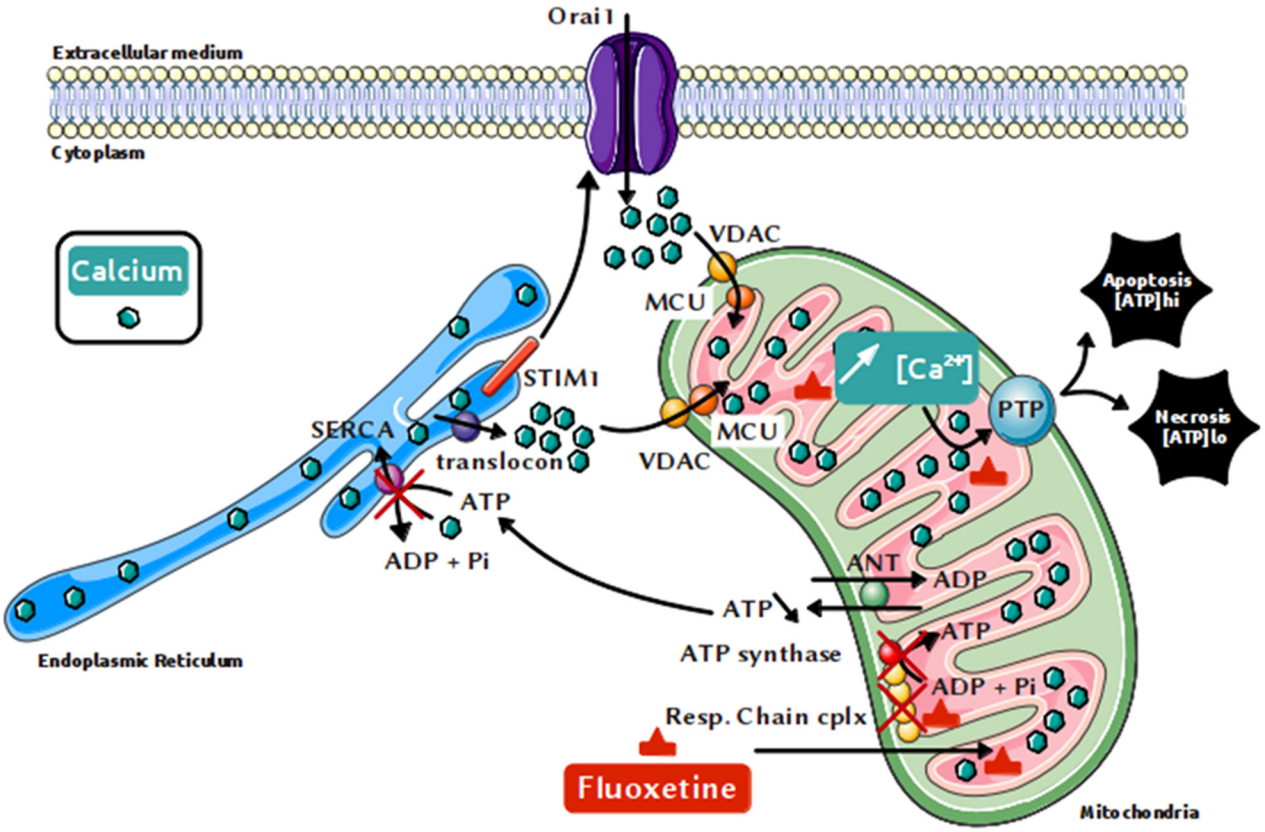


Figure 8: Proposed mechanism for the fluoxetine-induced increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ and cell death. Fluoxetine, known to enter mitochondria, is likely able to inhibit directly the respiratory chain, which is necessary for mitochondrial ATP production, and thus for pumping calcium into the ER via SERCAs. Calcium leaks from the ER via the translocon, leading to ER calcium depletion, which in turn activates the store-operated calcium channels Orai1 via the reticular STIM1 protein. Once released from the endoplasmic reticulum, calcium quickly accumulates into the mitochondria, leading to mitochondrial calcium overload and cell death, mainly by necrosis.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and PBLs

Jurkat cells and Jurkat variants (deficient for signaling proteins PLCγ1$^{-/-}$) were obtained from Dr. Patrick Legembre (ER440-OSS CLCC Eugène Marquis, Université de Rennes 1). HeLa cells were bought from DSMZ. Peripheral blood mononuclear cells PBMC from healthy donors were isolated by Ficoll gradient centrifugation. Blood pouches were obtained from the EFS (Etablissement Français du Sang) Aquitaine-Limousin, after written informed consent was obtained from participants. Monocytes were depleted by a 2h adherence step, and the naive PBLs were stimulated as described previously [54]. HeLa and Jurkat T-leukemic cell lines were maintained in RPMI supplemented with 8% (v/v) heat-inactivated FCS and 2mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO_2 incubator.

Pharmacological tools

Anisomycin, fluoxetine and ML9 were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, St-Quentin-Fallavier, France). RU360 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Oligomycin and rhTRAIL were obtained from Merck Millipore (Fontenay sous Bois, France) and AdipoGen (Liestal, Switzerland), respectively. 2-APB, BAPTA-AM, BTP2, TG and xestospongin C were obtained from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK).

Ca^{2+} monitoring

In cell populations, $[Ca^{2+}]_i$ was measured ratiometrically in Indo-1–loaded cells using a Hitachi F2500 spectrophotometer, as described previously [55]. Cells bathed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) were placed in a quartz cuvette under continuous stirring. The Fura 2 fluorescence response to $[Ca^{2+}]_i$ was recorded as the F_{340nm}/F_{380nm} fluorescence ratio. The values of the emitted fluorescence for each cell (F) were normalized to the starting fluorescence (F_0) and reported as F/F_0 (relative $[Ca^{2+}]_{cyt}$). Each experimental condition was repeated independently at least three times; values are reported as mean ± SD.

Single-cell $[Ca^{2+}]_i$ imaging was performed ratiometrically as described previously [54]. Cells were loaded with 5µM Fura2-PE3-AM for 30min at room temperature in (HBSS). Fura2-PE3-AM exhibits limited compartmentalization in intracellular stores and is leakage-resistant [56]. Imaging was controlled by Universal Imaging software, including MetaFluor and MetaMorph. All images were background-subtracted. Data processing was performed using OriginPro 7.5 software (OriginLab).

In some experiments, cells were placed in a Ca^{2+}-free medium, consisting of the HBSS described above in which $CaCl_2$ was omitted and 100µM EGTA was added in order to chelate residual Ca^{2+} ions. This medium was added to the cells just before recording to avoid intracellular calcium stores leaking.

Mitochondrial calcium imaging

Jurkat, PBLs and HeLa cells were loaded with Rhod-2 AM fluorescent probe (1µM, 2h, and 37°C). Cells were grown on glass coverslips and placed in an Attofluor observation chamber for confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta, with Planapochromat x63 oil immersion objective). Helium/Neon laser (543 nm) was used for excitation, and emitted fluorescence was recorded through a low-pass filter (560nm). Analysis was made with Zeiss software (Axiovision). Mitochondria were stained using Mitotracker green (200nM, 2h, and 37°C).

Real time membrane PIP_2 and cytosolic IP_3 imaging

A fusion protein between PH domain (Pleckstrin Homology domain) of PLCγ1 and GFP (GFP-PH) was used. This PH domain has a high selectivity for PIP_2 and a higher affinity for IP_3 than for PIP_2. It translocates thus from membrane to cytosol with IP_3. This system enables thus real time IP_3 production in living cells, with migration of green fluorescence (GFP) from the membrane to cytoplasm [57]. Construct was obtained from Pr. T. Meyer (Stanford University, CA, USA). HeLa cells were transfected with the Exgen500 kit (Euromedex) for plasmid expression.

Western blot

Cells were lysed into lysis buffer containing 1% Na deoxycholate (Sigma), 150mM NaCl, 10mM PO_4Na_2/K, pH 7.2 and supplemented with inhibitor cocktail (Sigma), 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate (New England Biolabs), phosphatase inhibitor (Thermo Fisher) and 5mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma). Benzonase nuclease (Santa Cruz) was added to reduce viscosity in protein extracts. Protein content was measured using BCA method (Biorad). Each sample was dissolved in Laemmli 5X buffer, and then denatured at 100°C for 10min. After SDS-PAGE and transfer onto nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare), membranes were incubated with goat polyclonal primary antibodies against p-AMPk (1/1000, Millipore) or AMPk (1/1000, Sigma) overnight at 4°C. Membranes were incubated with anti-goat peroxidase-conjugated anti-IgG secondary antibody (1/5000, Santa Cruz), developed using ECL substrate solution, exposed to the Fusion Fx7 (Thermo Fisher) and analyzed using Quantity One software (Biorad).

Respiration experiments

Respiration assays were performed using an Oroboros Oxygraph-2k. The oxygen consumption was measured polarographically at 37°C using a Clark oxygen electrode in a thermostatically controlled chamber. Respiratory rates (JO_2) were determined from the slope of a plot of O_2 concentration *versus* time, and normalized by million cells. Respiration assays were performed in the growth medium supplemented with HEPES 10mM, pH 7.2.

ATP measurements

Mitochondrial ATP levels were measured by transfecting HeLa cells with the mitochondrially targeted ATP-sensitive FRET-based probe (Mito-ATeam), as previously described [38]. Briefly, cells seeded on coverslips were washed in a modified Ringer's medium (in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.3) and images were collected using 440nm excitation and alternate 485/535 nm emission on an Axiovert S100 TV microscope through a ×40, 1.3 NA oil-immersion objective (Carl Zeiss AG, Switzerland) equipped with a 16-bit CCD camera, Xenon lamp and filter-based wavelength switcher (Visitron Systems GmbH, Germany). Minimum FRET emission ratios were obtained by washing cells in Ringer's were glucose was replaced by 2-deoxyglucose and contained 10µg/ml oligomycin. Relative changes in mitochondrial ATP are reported as background-subtracted FRET ratios normalized to baseline and minimum FRET emission ratios where Relative Mito-ATeam FRET = $((F_{335/485} - F_{min}) / F_{baseline})$. The loss of ATP is reported as Loss ATP = (1 - Relative Mito-ATeam FRET) at t=10min after stimulation. Bars show mean ± SEM of 3 independent experiments.

Cell death experiments

Cells were processed using annexin V – propidium-iodide (PI) apoptosis assay kit according to manufacturer's protocol (Life Technologies). A total of 10000 events were analyzed by flow cytometry.

Statistics

The results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of the indicated number of experiments (N=passage number, n=cell number). Statistical analysis was performed using the Student's t-test, a non-parametric Mann–Whitney test, or an ANOVA statistical test (Sigmastat). Differences between the values were considered significant when $p < 0.05$. * and ** mean p-values smaller than 0.05 and 0.01, respectively.

Abbreviations

AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside.

CRAC channels, Calcium Release-Activated Calcium channels.

ER, Endoplasmic Reticulum.

IP_3, Inositol 1,4,5-tris-Phosphate.

IP_3R, IP_3 Receptors.

MCU, Mitochondrial Calcium Uniporter.

PLC, PhosphoLipase C.

PTP, Permeability Transition Pore.

SERCA, Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase.

SOC, Store-Operated Channel.

SOCE, Store-Operated Calcium Entry.

SSRI, Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr P. Legembre (ER440-OSS CLCC Eugène Marquis, Université de Rennes 1) for the gift of Jurkat cells and Jurkat variants.

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by the National Cancer Institute (#2012-119).

REFERENCES

1. Wong DT, Bymaster FP and Engleman EA. Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication. Life Sciences. 1995; 57:411-441.
2. Hiemke C and Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. Pharmacol Ther. 2000; 85:11-28.
3. Levkovitz Y, Gil-Ad I, Zeldich E, Dayag M and Weizman A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. J Mol Neurosci. 2005; 27:29-42.
4. Stepulak A, Rzeski W, Sifringer M, Brocke K, Gratopp A, Kupisz K, Turski L and Ikonomidou C. Fluoxetine inhibits the extracellular signal regulated kinase pathway and suppresses growth of cancer cells. Cancer Biol Ther. 2008; 7:1685-1693.
5. Abdul M, Logothetis CJ and Hoosein NM. Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. J Urol. 1995; 154:247-250.

6. Arimochi H and Morita K. Characterization of cytotoxic actions of tricyclic antidepressants on human HT29 colon carcinoma cells. Eur J Pharmacol. 2006; 541:17-23.
7. Krishnan A, Hariharan R, Nair SA and Pillai MR. Fluoxetine mediates G0/G1 arrest by inducing functional inhibition of cyclin dependent kinase subunit (CKS)1. Biochem Pharmacol. 2008; 75:1924-1934.
8. Lee CS, Kim YJ, Jang ER, Kim W and Myung SC. Fluoxetine induces apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 through reactive oxygen species-dependent activation of nuclear factor-kappaB. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010; 106:446-453.
9. Serafeim A, Holder MJ, Grafton G, Chamba A, Drayson MT, Luong QT, Bunce CM, Gregory CD, Barnes NM and Gordon J. Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. Blood. 2003; 101:3212-3219.
10. Cloonan SM, Drozgowska A, Fayne D and Williams DC. The antidepressants maprotiline and fluoxetine have potent selective antiproliferative effects against Burkitt lymphoma independently of the norepinephrine and serotonin transporters. Leuk Lymphoma. 2010; 51:523-539.
11. Mun AR, Lee SJ, Kim GB, Kang HS, Kim JS and Kim SJ. Fluoxetine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. Anticancer Res. 2013; 33:3691-3697.
12. Tutton PJ and Barkla DH. Influence of inhibitors of serotonin uptake on intestinal epithelium and colorectal carcinomas. Br J Cancer. 1982; 46:260-265.
13. Koh SJ, Kim JM, Kim IK, Kim N, Jung HC, Song IS and Kim JS. Fluoxetine inhibits NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 301:G9-19.
14. Grygier B, Arteta B, Kubera M, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Leskiewicz M, Curzytek K, Duda W, Lason W and Maes M. Inhibitory effect of antidepressants on B16F10 melanoma tumor growth. Pharmacol Rep. 2013; 65:672-681.
15. Edgar VA, Genaro AM, Cremaschi G and Sterin-Borda L. Fluoxetine action on murine T-lymphocyte proliferation: participation of PKC activation and calcium mobilisation. Cell Signal. 1998; 10:721-726.
16. Edgar VA, Sterin-Borda L, Cremaschi GA and Genaro AM. Role of protein kinase C and cAMP in fluoxetine effects on human T-cell proliferation. Eur J Pharmacol. 1999; 372:65-73.
17. Genaro AM, Edgar VA and Sterin-Borda L. Differential effects of fluoxetine on murine B-cell proliferation depending on the biochemical pathways triggered by distinct mitogens. Biochem Pharmacol. 2000; 60:1279-1283.
18. Slamon ND, Mead C, Morgan C, Mitchell A and Pentreath VW. The involvement of calcium in the protective and toxic (nonlinear) responses of rodent and human astroglial cells. Nonlinearity Biol Toxicol Med. 2005; 3:79-95.
19. Schipke CG, Heuser I and Peters O. Antidepressants act on glial cells: SSRIs and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. J Psychiatr Res. 2011; 45:242-248.
20. Tang K-Y, Lu T, Chang C-H, Lo Y-K, Cheng J-S, Wang J-L, Chang H-T and Jan C-R. Effect of fluoxetine on intracellular Ca2+levels in bladder female transitional carcinoma (BFTC) cells. Pharmacological Research. 2001; 43:503-508.
21. Zhivotovsky B and Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. Cell Calcium. 2011; 50:211-221.
22. Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4:552-565.
23. Mukherjee J, Das MK, Yang ZY and Lew R. Evaluation of the binding of the radiolabeled antidepressant drug, 18F-fluoxetine in the rodent brain: an in vitro and in vivo study. Nucl Med Biol. 1998; 25:605-610.
24. Mogami H, Lloyd Mills C and Gallacher DV. Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca2+, potentiates Ins(1,4,5)P3-mediated Ca2+ release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. Biochem J. 1997; 324:645-651.
25. Johnson AE and van Waes MA. The Translocon: A Dynamic Gateway at the ER Membrane. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 1999; 15:799-842.
26. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E and Prevarskaya N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. J Cell Sci. 2004; 117:4135-4142.
27. Towler MC and Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. Circulation Research. 2007; 100:328-341.
28. Imamura H, Huynh Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T and Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009; 106:15651-15656.
29. Peter ME and Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ. 2003; 10:26-35.
30. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiological Reviews. 2002; 82:47-95.
31. Lennon SV, Martin SJ and Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. Cell Prolif. 1991; 24:203-214.
32. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA and Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis. 2003; 8:345-352.
33. Gobin V, De Bock M, Broeckx BJG, Kiselinova M, De Spiegelaere W, Vandekerckhove L, Van Steendam K, Leybaert L and Deforce D. Fluoxetine suppresses calcium

signaling in human T lymphocytes through depletion of intracellular calcium stores. Cell Calcium. 2015; 58:254-263.

34. Kim HJ, Choi JS, Lee YM, Shim EY, Hong SH, Kim MJ, Min DS, Rhie DJ, Kim MS, Jo YH, Hahn SJ and Yoon SH. Fluoxetine inhibits ATP-induced [Ca(2+)](i) increase in PC12 cells by inhibiting both extracellular Ca(2+) influx and Ca(2+) release from intracellular stores. Neuropharmacology. 2005; 49:265-274.
35. Cloonan SM and Williams DC. The antidepressants maprotiline and fluoxetine induce Type II autophagic cell death in drug-resistant Burkitt's lymphoma. Int J Cancer. 2011; 128:1712-1723.
36. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R and Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. FASEB J. 2006; 20:1215-1217.
37. Landolfi B, Curci S, Debellis L, Pozzan T and Hofer AM. Ca2+ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells. J Cell Biol. 1998; 142:1235-1243.
38. De Marchi U, Castelbou C and Demaurex N. Uncoupling Protein 3 (UCP3) Modulates the Activity of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) by Decreasing Mitochondrial ATP Production. Journal of Biological Chemistry. 2011; 286:32533-32541.
39. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, Dewailly E, Delcourt P, Lepage G, Lotteau S, Ducreux S, Prevarskaya N and Van Coppenolle F. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. The FASEB Journal. 2013; 27:1600-1609.
40. Canová NK, Kmoníčková E, Martínek J, Zídek Z and Farghali H. Thapsigargin, a selective inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases, modulates nitric oxide production and cell death of primary rat hepatocytes in culture. Cell Biol Toxicol. 2007; 23:337-354.
41. Liu K-H, Yang S-T, Lin Y-K, Lin J-W, Lee Y-H, Wang J-Y, Hu C-J, Lin E-Y, Chen S-M, Then C-K and Shen S-C. (2015). Fluoxetine, an antidepressant, suppresses glioblastoma by evoking AMPAR-mediated calcium-dependent apoptosis.
42. Tarasov AI, Griffiths EJ and Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca2+. Cell Calcium. 2012; 52:28-35.
43. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E and Pinton P. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. Biochimica et biophysica acta. 2009; 1787:1342-1351.
44. Spät A, Szanda G, Csordás G and Hajnóczky G. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. Cell Calcium. 2008; 44:51-63.
45. Zoratti M and Szabò I. The mitochondrial permeability transition. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes. 1995; 1241:139-176.
46. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S and Nicotera P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. The Journal of Experimental Medicine. 1997; 185:1481-1486.
47. Rasola A and Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca2+-dependent apoptosis and necrosis. Cell Calcium. 2011; 50:222-233.
48. Rasola A, Sciacovelli M, Pantic B and Bernardi P. Signal Transduction to the Permeability Transition Pore. FEBS letters. 2010; 584:1989-1996.
49. Bernardi P and Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. Subcell Biochem. 2007; 45:481-506.
50. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H and Missiaen L. Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2011; 3:a004317.
51. Wille SM, Cooreman SG, Neels HM and Lambert WE. Relevant issues in the monitoring and the toxicology of antidepressants. Crit Rev Clin Lab Sci. 2008; 45:25-89.
52. Preskorn SH. Clinical Pharmacology of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. Professional Communications; Caddo, OK. 1996.
53. Borys DJ, Setzer SC, Ling LJ, Reisdorf JJ, Day LC and Krenzelok EP. Acute fluoxetine overdose: a report of 234 cases. Am J Emerg Med. 1992; 10:115-120.
54. Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Selva E, Khadra N, Daburon S, Contin-Bordes C, Blanco P, Le Seyec J, Ducret T, Counillon L, Moreau JF, Hofman P, Vacher P and Legembre P. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. PLoS Biol. 2011; 9:e1001090.
55. Sorin B, Goupille O, Vacher AM, Paly J, Djiane J and Vacher P. Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. J Biol Chem. 1998; 273:28461-28469.
56. Vorndran C, Minta A and Poenie M. New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. Biophys J. 1995; 69:2112-2124.
57. Stauffer TP, Ahn S and Meyer T. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells. Curr Biol. 1998; 8:343-346.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 20 Apr 2016 | Accepted 1 Dec 2016 | Published 23 Jan 2017

DOI: 10.1038/ncomms14124 OPEN

mTORC1 inhibition in cancer cells protects from glutaminolysis-mediated apoptosis during nutrient limitation

Victor H. Villar[1], Tra Ly Nguyen[1], Vanessa Delcroix[2], Silvia Terés[1], Marion Bouchecareilh[3], Bénédicte Salin[3], Clément Bodineau[1], Pierre Vacher[2], Muriel Priault[3], Pierre Soubeyran[2] & Raúl V. Durán[1]

A master coordinator of cell growth, mTORC1 is activated by different metabolic inputs, particularly the metabolism of glutamine (glutaminolysis), to control a vast range of cellular processes, including autophagy. As a well-recognized tumour promoter, inhibitors of mTORC1 such as rapamycin have been approved as anti-cancer agents, but their overall outcome in patients is rather poor. Here we show that mTORC1 also presents tumour suppressor features in conditions of nutrient restrictions. Thus, the activation of mTORC1 by glutaminolysis during nutritional imbalance inhibits autophagy and induces apoptosis in cancer cells. Importantly, rapamycin treatment reactivates autophagy and prevents the mTORC1-mediated apoptosis. We also observe that the ability of mTORC1 to activate apoptosis is mediated by the adaptor protein p62. Thus, the mTORC1-mediated upregulation of p62 during nutrient imbalance induces the binding of p62 to caspase 8 and the subsequent activation of the caspase pathway. Our data highlight the role of autophagy as a survival mechanism upon rapamycin treatment.

[1] Institut Européen de Chimie et Biologie, INSERM U1218, Université de Bordeaux, 2 Rue Robert Escarpit, Pessac 33607, France. [2] Institut Bergonié, INSERM U1218, 229 Cours de l'Argonne, Bordeaux 33076, France. [3] Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Université de Bordeaux, 1 Rue Camille Saint-Saëns, Bordeaux 33077, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.V.D. (email: raul.duran@inserm.fr).

mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) is a highly conserved serine/threonine kinase complex that integrates several inputs, including amino acid availability, to regulate different cellular processes such as cell growth, anabolism and autophagy[1,2]. mTORC1 pathway is aberrantly activated in 80% of human cancers[3]. Thus, the inhibition of this pathway was considered a relevant approach to treat cancer. However, for still unclear reasons, rapamycin analogues have shown only modest effects in clinical trials[4–6]. Hence, understanding the molecular mechanism by which tumour cells escape from mTORC1 inhibition is a main objective to design new targeted therapies that efficiently eliminate cancer cells. As mTORC1 is strongly regulated by the metabolism of certain amino acids, particularly glutamine, leucine and arginine, there is an intense research nowadays to elucidate how the altered metabolism of amino acids during malignant transformation might play a role in mTORC1 upregulation and in rapamycin treatment resistance.

Glutamine is the most abundant amino acid in the blood and a nitrogen source for cells[7,8]. This amino acid has been described as a crucial nutrient for tumour proliferation, and indeed a vast number of different types of tumour cells consume abnormally high quantities of glutamine and develop glutamine addiction[9–12]. Glutamine is mostly degraded in the cell through glutaminolysis. Glutaminolysis comprises two-step enzymatic reactions, whereby glutamine is first deamidated to glutamate, in a reaction catalysed by glutaminase (GLS), and then glutamate is deaminated to α-ketoglutarate (αKG), in a reaction catalysed by glutamate dehydrogenase. In addition, leucine, another important amino acid from a signalling point of view, activates allosterically glutamate dehydrogenase and promotes the production of glutaminolitic αKG (refs 8,13). Therefore, leucine and glutamine cooperate to produce αKG, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle. Besides this anaplerotic role of glutamine, glutaminolysis also activates mTORC1 pathway and inhibits macroautophagy[14]. Macroautophagy (hereafter simply autophagy) is a catabolic process regulated by mTORC1 pathway, through which lysosomal-degradation of cellular components provides cells with recycled nutrients[15–18].

Although it is known that glutaminolysis is a source to replenish tricarboxylic acid cycle and also activates mTORC1, the capacity of glutaminolysis to sustain mTORC1 activation and cell growth in the long term in the absence of other nitrogen sources has not been elucidated. Here we report that, surprisingly, the long-term activation of glutaminolysis in the absence of other amino acids induces the aberrant inhibition of autophagy in an mTORC1-dependent manner. This inhibition of autophagy during amino acid restriction led to apoptotic cell death due to the accumulation of the autophagic protein p62 and the subsequent activation of caspase 8. Of note, the inhibition of mTORC1 restores autophagy and blocks the apoptosis induced by glutaminolysis activation. Our results highlight the tumour suppressor features of mTORC1 during nutrient restriction and provide with an alternative explanation for the poor outcome obtained using mTORC1 inhibitors as an anticancer therapy.

Results

Long-term glutaminolysis decreased cell viability. As we have previously shown that short-term glutaminolysis (15–60 min) is sufficient and necessary to activate mTORC1 and to sustain cell growth (ref. 14), we first explored the capacity of glutaminolysis to serve as a metabolic fuel during amino acid starvation at long term in cancer cells. For the long-term activation of glutaminolysis, we added glutamine (the source of glutaminolysis) and leucine (the allosteric activator of glutaminolysis) to otherwise amino acid-starved cells as previously described[14], and the cells were incubated in these conditions during 24–72 h. As previously observed, the incubation of a panel of different cancer cell lines, including U2OS, A549 and JURKAT, in the absence of all amino acids arrested cell proliferation, but it did not affect cell viability significantly (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 1A). Strikingly, the activation of glutaminolysis by adding leucine and glutamine (LQ treatment) caused a strong decrease in the number of cells incubated in these conditions (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 1B). Similar results were obtained in HEK293 cells (Fig. 1a,b). To confirm whether this decrease in the number of cells was related to an increase in cell death or a decrease in cell proliferation, we measured the percentage of cell death using the trypan blue exclusion assay, and we determined cell viability using a clonogenic assay. We observed that glutaminolysis activation using LQ treatment increased the percentage of cell death in all the tested cell lines (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1C). In addition, LQ treatment during amino acid restriction strongly reduced the number of colonies formed in a clonogenic assay (Fig. 1d,e and Supplementary Fig. 1D). Further confirming that glutaminolysis was responsible for cell death induction upon LQ treatment, we used a cell-permeable derivative of αKG, dimethyl-α-ketoglutarate (DMKG), and we observed that the addition of DMKG to amino acid-starved cells induced cell death to a similar extent than LQ treatment (Fig. 1a–c). As αKG is the final product of glutaminolysis, and we previously showed that LQ treatment efficiently increases the intracellular levels of αKG (ref. 14), this result suggested that the ability of LQ treatment to induce cell death correlates with the activation of glutaminolysis and αKG production. To finally confirm the active role of glutaminolysis in LQ-induced cell death, we inhibited the enzyme GLS1 (both genetically using siRNA and pharmacologically using the inhibitors DON and BPTES), responsible for the first step of glutaminolysis. As shown in Fig. 1f–i and in Supplementary Fig. 1E,F, both the genetic and the pharmacologic inhibition of GLS1 prevented the LQ-induced cell death in U2OS and HEK293 cells, with no effect on the viability of the cells during amino acid starvation. Of note, GLS1 inhibition using DON or GLS1 silencing using siRNA did not prevent the induction of cell death mediated by DMKG treatment (Supplementary Fig. 1G,H), as DMKG bypasses the inhibition of GLS1 to produce αKG. Taken together, these results strongly support the conclusion that the unbalanced production of αKG by glutaminolysis during amino acid restriction decreases cell viability. The specificity of glutaminolysis in the observed cell death was confirmed as the addition of all the amino acids did not decrease cell viability (Supplementary Fig. 1I,J). Thus, glutaminolysis (a well-known pro-proliferative process) causes cell death if it is activated during nutrient restriction, a result that pointed at the importance of nutritional balance in the control of cancer cell viability.

Unbalanced glutaminolysis induced apoptosis. We next investigated whether the cell death induced by glutaminolysis was apoptosis. For this purpose, we analysed several apoptotic markers, such as the cleavage of caspases 3, 8 and 9, the cleavage of PARP, and the expression of the pro-apoptotic protein BAX after 72 h of amino acid restriction in several tumour cell lines, by western blot and by immunofluorescence. We also analysed the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-XL and MCL-1. We observed that LQ treatment or DMKG treatment increased the levels of cleaved caspase 3, cleaved PARP and BAX in U2OS (Fig. 2a–c), A549 (Supplementary Fig. 2A), JURKAT (Supplementary Fig. 2B) and HEK293A cells (Supplementary Fig. 2D,F), in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. 2C). We also observed an increase in the cleavage of caspase 8, while we

did not detect any changes in cleaved caspase 9 (Fig. 2a). Similarly, we did not see any decrease in the levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-XL and MCL-1 (Fig. 2a). In agreement with these results, both LQ and DMKG treatment significantly increased the late apoptotic population compared to amino acid-starved cells as determined by the double positive annexin V/PI staining observed by flow cytometry (Fig. 2d,e). Further confirming that LQ-induced cell death is mediated by an activation of apoptosis, we used zVAD-FMK, a specific inhibitor of caspases. As shown in Fig. 2f,g, the treatment of cells with zVAD-FMK completely abolished the LQ-mediated cell death and activation of the apoptotic markers, supporting that LQ-induced cell death can be explained by an increase in apoptosis.

We next assayed whether αKG was a necessary byproduct for the induction of apoptosis upon LQ treatment. For this purpose, we inhibited glutaminolysis either genetically (siRNA GLS1) and pharmacologically (using DON or BPTES). Following this approach, we confirmed that the silencing of GLS1 or the inhibition of GLS1 drastically reduced the induction of cleaved caspase 3, cleaved PARP and BAX by LQ treatment (Fig. 2h,i and Supplementary Fig. 2E,F). Likewise, the pharmacological inhibition of GLS1 blocked the increase in the population of annexin V/PI-positive cells induced by LQ (Supplementary Fig. 2G,H). In contrast to LQ treatment, and as expected, the addition of all amino acids did not induce apoptosis (Supplementary Fig. 2I). Therefore, we concluded that the

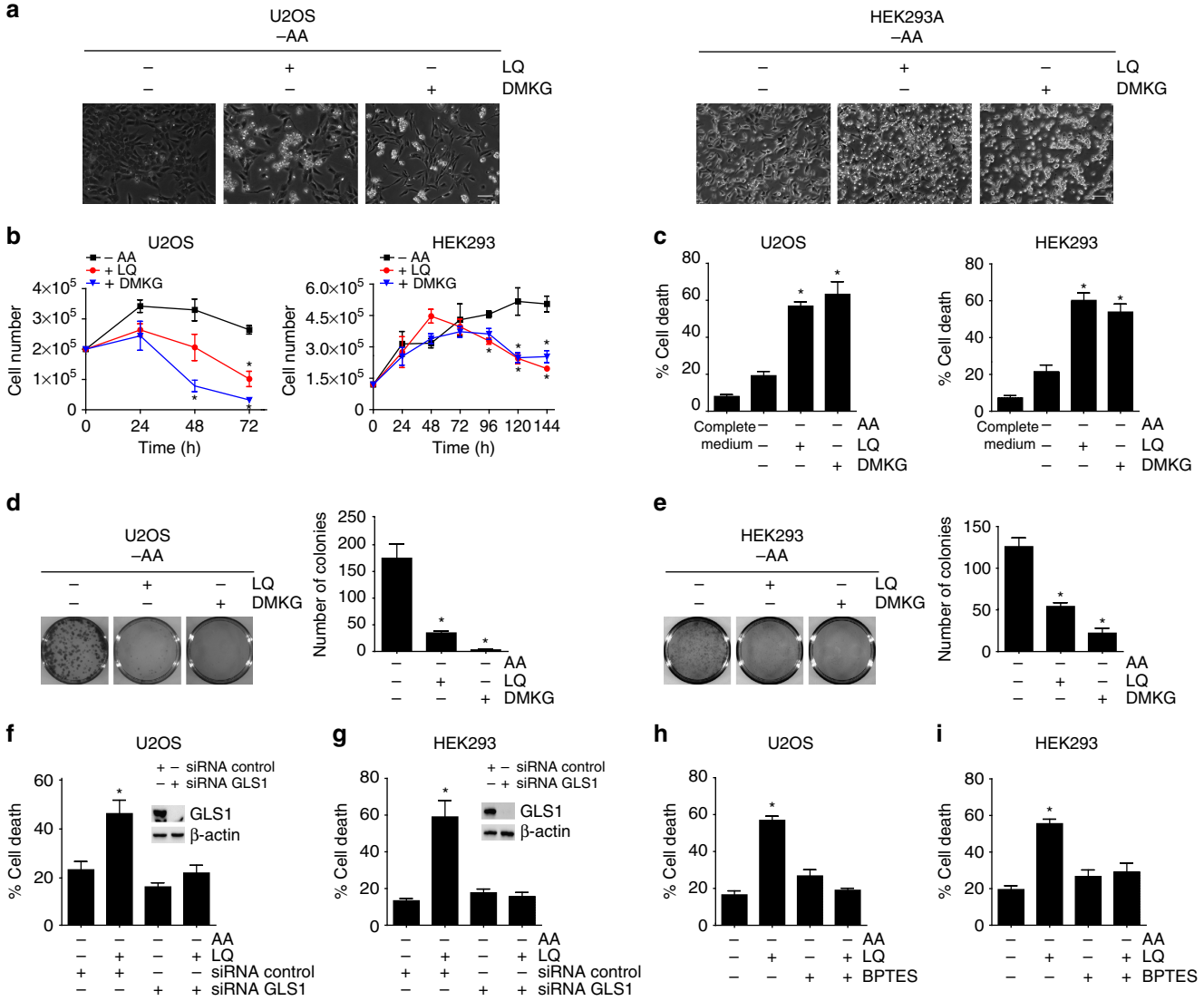


Figure 1 | Long-term glutaminolysis activation during amino acid restriction decreased cell viability. (**a**) U2OS (left panel) and HEK923 (right panel) cells were starved for all the amino acids (− AA) in the presence or absence of LQ or DMKG (2 mM) for 72 h (U2OS) or 144 h (HEK293). Representative microscopy images of the cells are shown for the indicated conditions. The scale bar represents 100 μm. (**b**) Proliferation curves for U2OS and HEK293 were determined upon − AA, in the presence or the absence of LQ and DMKG after 24–144 h. (**c**) Percentage of cell death was estimated using trypan blue exclusion assay upon LQ or DMKG treatment after 72 h for U2OS or 144 h for HEK293, as indicated. (**d**,**e**) A representative image of a clonogenic assay (left panel) and the quantification of the colonies formed in three independent experiments (right panel) are shown for U2OS (**d**) and HEK293 (**e**). (**f**,**g**) Percentage of cell death was estimated in cells depleted of GLS1 (siRNA GLS1) upon amino acids starvation either in the presence or the absence of LQ after 72 h for U2OS (**f**) and 144 h for HEK293 (**g**). (**h**,**i**) Percentage of cell death was estimated upon amino acids starvation either in the presence or the absence of LQ and BPTES (30 μM) after 72 h for U2OS and 144 h for HEK293 cells. Graphs show mean values ± s.e.m. ($n=3$). *$P<0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni).

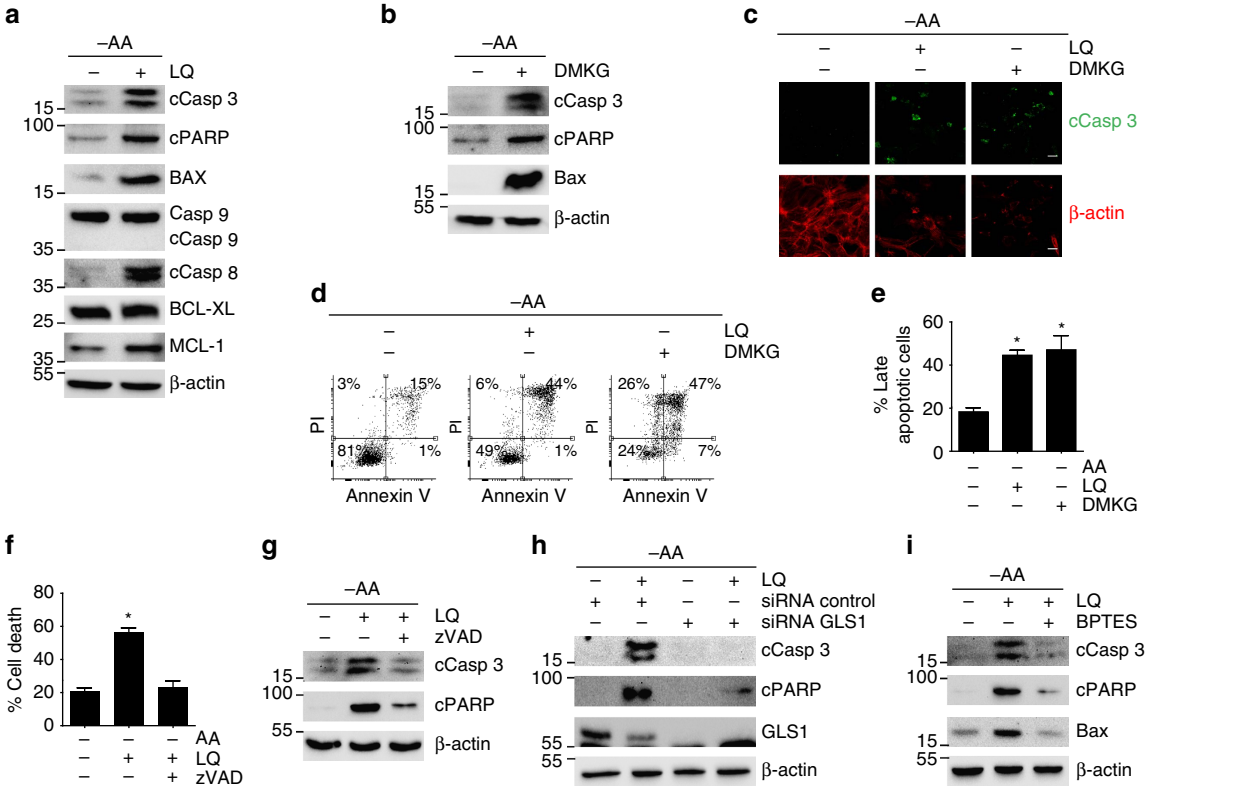


Figure 2 | Glutaminolysis activation during amino acid restriction induced apoptosis. (**a**,**b**) U2OS cells were starved for amino acid either in the presence or the absence of LQ (**a**) or DMKG (2 mM) (**b**). The level of the pro-apoptotic proteins (caspase 3, PARP, BAX, Caspase 8 and caspase 9) and anti-apoptotic member of the Bcl-2 family (Bcl-XL and MCL-1) were determined by western blot for U2OS cells treated as indicated. The scale bar represents 20 μm. (**c**) Immunofluorescence analysis of cleaved caspase 3 and actin filaments are shown for LQ-treated and DMKG-treated cells upon amino acid starvation after 72 h in U2OS cells. (**d**) Flow cytometry analysis of annexin V/PI staining of U2OS cells treated with LQ or DMKG as indicated. (**e**) Quantification of late apoptosis (annexin V/PI-positive cells) for the indicated conditions in U2OS cells. (**f**,**g**) Effect of the inhibition of apoptosis using zVAD-FMK (1 μM) on the percentage of cell death (**f**) and apoptotic markers (**g**) in LQ-treated U2OS cells. (**h**,**i**) Western blot analysis of apoptotic markers upon GLS1 silencing using siRNA (**h**) or upon GLS inhibition using BPTES (**i**) in LQ-treated U2OS cells. Graphs show mean values ± s.e.m. ($n=3$). *$P<0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni).

increase in glutaminolytic αKG production during amino acids restriction induced apoptotic cell death.

In order to gain some insights in the mechanism of apoptosis induction mediated by LQ, we investigated if the observed increased levels of the pro-apoptotic protein BAX played a mechanistic role in the induction of apoptosis. Indeed, the downregulation of BAX using siRNA reduced cell death, caspase 3/8 cleavage, and PARP cleavage in LQ-treated cells (Supplementary Fig. 2J,K), suggesting that BAX upregulation is necessary for the activation of apoptosis by LQ treatment. This was a rather surprising result, as we previously observed an activation of caspase 8, and not caspase 9 (Fig. 2a), as canonically described for BAX (ref. 19). Indeed, the increased protein levels of BAX observed in LQ treated cells did not correlate with an increase in BAX transcription, as no significant differences in BAX mRNA levels were observed upon LQ addition (Supplementary Fig. 2L). Accordingly, both the levels and activity of p53 (as determined by p21 as a readout), a major transcriptional regulator of BAX (ref. 20), were decreased upon glutaminolysis activation (Supplementary Fig. 2M), further discarding an increase in the transcription of BAX in LQ-treated cells. Finally, we also investigated if LQ-treated cells showed a BAX-mediated induction of the intrinsic pathway of apoptosis that promotes the release of cytochrome c from the mitochondria, which in turn activates the caspase 9. As shown in Supplementary Fig. 2N, LQ treatment did not induce the release of cytochrome c from the mitochondria, in agreement with the lack of caspase 9 cleavage previously observed. Thus, we concluded that BAX played a non-canonical mechanistic role in LQ-induced apoptosis.

mTORC1 inhibition prevented glutaminolysis induced apoptosis. We have shown previously that short-term (15 min) glutaminolysis is sufficient and necessary to activate mTORC1 pathway[14]. However, whether glutaminolysis is sufficient to activate mTORC1 at long term (72 h) was not clear. Hence, we investigated if the induction of apoptosis mediated by the activation of glutaminolysis in the absence of other amino acids correlated with the activation of mTORC1. Indeed, the activation of glutaminolysis adding LQ to amino acid-starved cells, or the treatment with DMKG, increased the phosphorylation S6K (Thre389), S6 (Ser235/236) and 4EBP1 (Ser37/46), all of them downstream targets of mTORC1, after 72 h (Supplementary Fig. 2A–I). In contrast, LQ treatment did not affect the activation of mTORC2, as the phosphorylation of its downstream target AKT at Ser473 (refs 2,21) was not affected (Fig. 3d). These results confirmed that long-term activation of glutaminolysis adding glutamine and leucine, even in the absence of other amino acids, is sufficient to activate mTORC1, but has not effect towards mTORC2, upon amino acid starvation. In addition, the pharmacological inhibition of GLS (using DON or BPTES) abrogated the activation of mTORC1 induced by LQ treatment, supporting a mechanistic role of glutaminolytic αKG

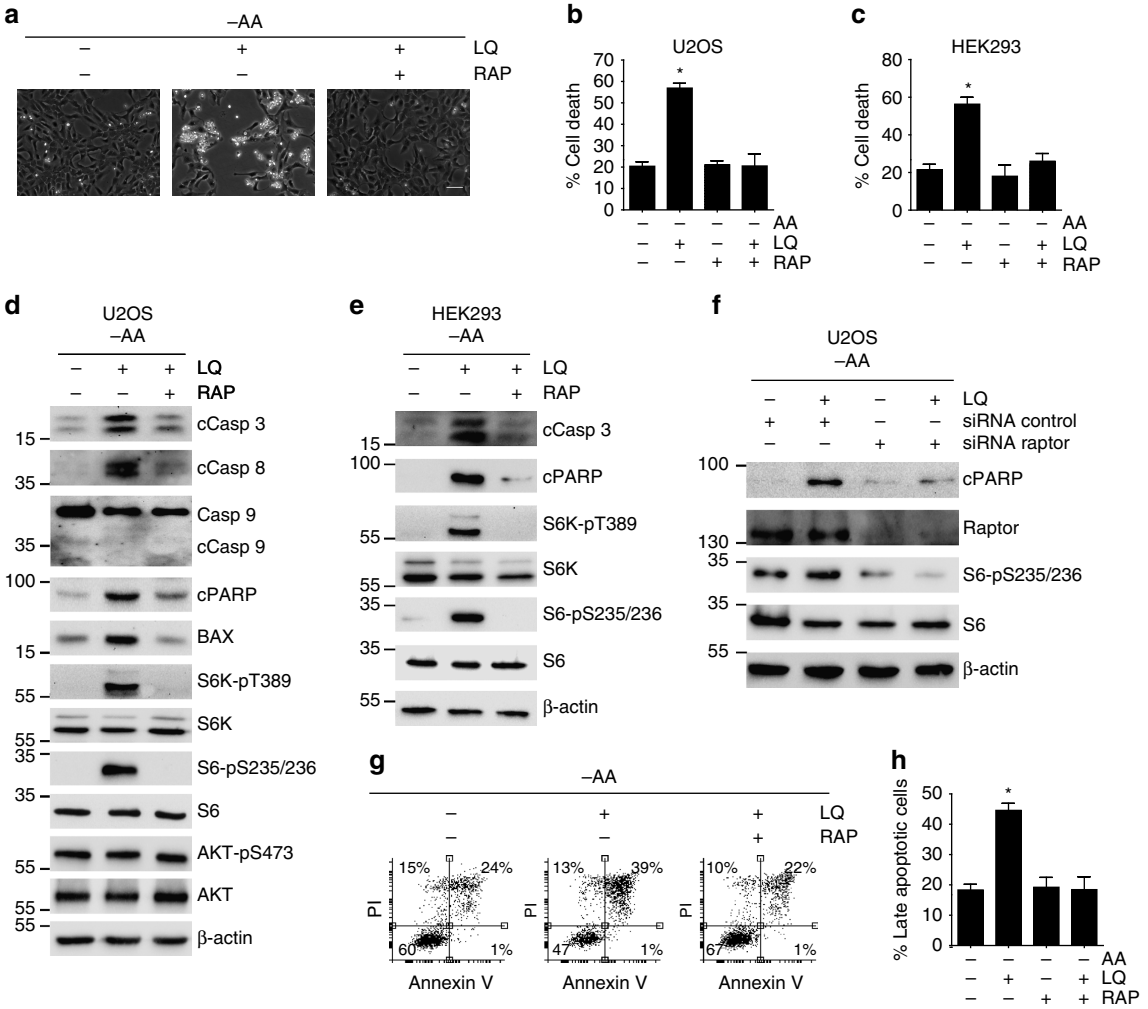


Figure 3 | mTORC1 inhibition prevented the glutaminolysis induced apoptosis. (**a**) Representative microscopy image of U2OS cells upon LQ treatment either in the presence or the absence of rapamycin after 72 h. The scale bar represents 100 μm. (**b**,**c**) Percentage of cell death as estimated using trypan blue exclusion assay is U2OS cells (**b**) or HEK293 cells (**c**) upon LQ treatment either in the presence or the absence of rapamycin for 72 h (U2OS) or 144 h (HEK293). (**d**,**e**) Western blot analysis of apoptotic markers and mTORC1 downstream targets upon rapamycin (RAP) addition in LQ-treated U2OS cells (**d**) and HEK293 cells (**e**). (**f**) Western blot analysis of apoptotic markers and mTORC1 downstream targets upon the silencing of Raptor using siRNA (thus inhibiting mTORC1 activity) in LQ-treated U2OS cells. (**g**) Flow cytometry analysis of annexin V/PI staining of U2OS cells treated with LQ and rapamycin as indicated. (**h**) Quantification of late apoptosis (annexin V/PI-positive cells) for the U2OS cells treated as in **g**, as indicated. Graphs show mean values ± s.e.m. ($n=3$). *$P<0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni).

levels in the activation of mTORC1 at long term, as previously demonstrated for short-term glutaminolysis[14] (Supplementary Fig. 2E–H).

The translocation of mTORC1 to the surface of the lysosome is a crucial step for its activation[22], and indeed, we previously showed that short-term glutaminolysis was sufficient to induce the lysosomal translocation of mTORC1 (ref. 14). Hence, we evaluated whether long-term glutaminolysis was also sufficient to sustain the localization of mTORC1 at the surface of the lysosome. For this purpose, we determined the colocalization between mTOR and CD63, a late endosomal and lysosomal marker, by confocal microscopy. As shown in Supplementary Fig. 3C, mTOR showed a disperse distribution throughout the cytoplasm when cancer cells were incubated in the absence of amino acids. In contrast, the activation of glutaminolysis by either LQ treatment or DMKG treatment in amino acid-restricted cells was sufficient to sustain the co-localization of mTOR and CD63 even after 72 h of treatment, again confirming that long-term glutaminolysis is sufficient to induce the lysosomal localization of mTORC1, prior to its activation. Furthermore, as mTORC1 activity regulates cell size[23], we also confirmed that the activation of mTORC1 by long-term glutaminolysis increased cell size. As shown in Supplementary Fig. 3D, while the withdrawal of amino acids decreased cell size, the activation of glutaminolysis (LQ treatment) maintained the size of the cells to a similar level than cells grown in a complete medium. As expected, the inhibition of mTORC1 using rapamycin in LQ-treated cells decreased the cell size to a similar extent than amino acids starvation. Altogether, these results strongly support that glutaminolysis is sufficient to maintain mTORC1 active upon amino acid deprivation at long term (72 h). This is an abnormal activation of mTORC1, as the mTORC1-dependent activation of cell growth does not seem viable for a prolonged time in conditions of amino acid restriction. Indeed, it is already known that the hyperactivation of mTORC1 in TSC2 −/− MEFs leads to cell death upon nutrient deprivation[24–26]. Therefore, we hypothesized that this unbalanced activation of mTORC1 may be mechanistically linked to the glutaminolysis-mediated apoptosis.

To evaluate the mechanistic link between the activation of mTORC1 and glutaminolysis-induced apoptosis, we followed

both a genetic and pharmacological approach to inhibit mTORC1 upon LQ treatment to determine whether the induction of apoptosis was affected. First, we observed that mTORC1 inhibition using rapamycin efficiently prevented the increase in cell death mediated by glutaminolysis in U2OS, and HEK293 cells (Fig. 3a–c). We next confirmed that the activation of glutaminolysis adding LQ to amino acid-starved cells induced the concomitant activation of mTORC1, as determined by S6K phosphorylation and S6 phosphorylation, and the activation of apoptosis, as determined by the cleavage of caspase 3, caspase 8 and PARP, in several cellular models (Fig. 3d,e and Supplementary Fig. 3E). Very importantly, the efficient pharmacological inhibition of mTORC1 using rapamycin (assessed by the reduction in the phosphorylation of mTORC1 downstream targets S6K, S6 and 4EBP1) completely prevented the activation of caspase pathway by glutaminolysis, as rapamycin treatment in LQ-induced cells was sufficient to drastically reduce the cleavage of caspase 3, caspase 8 and PARP, and to prevent the upregulation of BAX (Fig. 3d,e and Supplementary Fig. 3E). Similar results were obtained with a different inhibitor of mTORC1 (PP242, which is a dual inhibitor of both mTORC1 and mTORC2), and with the genetic inhibition of mTORC1 using an siRNA that efficiently silenced Raptor, a mTORC1-specific component[27,28] (Fig. 3f and Supplementary Fig. 3F). In contrast, the genetic inhibition of mTORC2 using an siRNA against Rictor did not block apoptosis induction (Supplementary Fig. 3G). Furthermore, mTORC1 inhibition using rapamycin abrogated the increase in the late apoptotic population mediated by LQ treatment. Thus, as shown in Fig. 3g,h, although rapamycin treatment did not affect the percentage of annexin V/PI-positive population in amino acid-starved cells, it prevented the increase in the percentage of annexin V/PI-positive cells induced by LQ.

The results presented above strongly suggest that glutaminolysis-induced apoptosis is mediated by the aberrant activation of mTORC1 during amino acid limitation. This very important observation suggests that mTORC1, besides its well-known function as a tumour promoter, also exhibits tumour suppressor features during nutritional limitation, a conclusion with important consequences in terms of targeting mTOR as anticancer-therapy. Of note, the capacity of unbalanced glutaminolysis to induce cell death was also evident in a genetic background showing mTORC1 upregulation, such as the case of TSC2 −/− MEFs. Indeed, we observed that LQ-treatment-induced caspase 3 cleavage in TSC2 −/− MEFs, and rapamycin treatment efficiently abrogated this effect (Supplementary Fig. 3H), underscoring the physiological relevance of our finding in a genetic context of mTORC1 overactivation.

UPR did not participate in glutaminolysis mediated apoptosis. In order to understand the cellular mechanism by which the unbalanced activation of mTORC1 induced apoptosis during nutrient limitation, we first investigated the potential role of endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR) (refs 24,29,30) upon glutaminolysis activation. As shown in Supplementary Fig. 3I, we did not observe any change in the levels of Bip/GRP78, elF2α-pS52, HErpud1 or PDI upon LQ treatment as determined by western blot, all of them being markers of ER stress and UPR. Similarly, the inhibition of mTORC1 using rapamycin in these conditions did not affect the levels of those proteins. This result suggests that the activation of glutaminolysis and mTORC1 during amino acid restriction did not induce an ER stress, neither activated UPR by the time at which apoptosis was already activated. This result does not support an active role of UPR and ER stress in the mechanism of apoptosis activation mediated by mTORC1.

As we observed that LQ-treatment induced the activation of caspase 8, we investigated if the extrinsic pathway of apoptosis (activated by apoptosis-inducing ligands such as FasL, TRAIL or TNFα, and leading to the activation of caspase 8 (ref. 31)) was involved in LQ-mediated apoptosis, and whether rapamycin treatment had an effect on the capacity of the extrinsic pathway to induce apoptosis. However, we did not observe any change in the levels of FasL, TRAIL or TNFα upon LQ treatment either in the presence or the absence of rapamycin (indeed, no detectable levels of FasL or TNFα were appreciated in WB). Similarly, we did not observe any change in the levels of the death receptor Fas (Supplementary Fig. 3J). This result discards that mTORC1 inhibition restricted translation of TNFα, FasL or TRAIL as a mechanism to explain cell death via caspase 8. Further sustaining this conclusion, rapamycin treatment did not block the capacity of FasL or TRIAL to induce apoptotic cell death (Supplementary Fig. 3K–N), discarding that the protective effect of rapamycin treatment involved the modulation of ligand-induced apoptosis.

Autophagy inhibition associated to unbalanced glutaminolysis. The activation of mTORC1 is known to inhibit the initiation of autophagy[32–36]. Autophagy is a degradative process that maintains metabolism and survival in condition of nutrient limitation[8,16]. Previously we have reported that the short-term activation of glutaminolysis inhibits autophagy in an mTORC1-dependent manner[14]. Now, we wanted to explore whether the activation of apoptosis observed upon the unbalanced activation of glutaminolysis/mTORC1 during nutrient restriction correlated with an inhibition of autophagy. First, and as previously shown, we observed that the inhibition of mTORC1 induced by long-term amino acids withdrawal (8–72 h) led to the induction of autophagy. As shown in Fig. 4a,b and Supplementary Fig. 4A,B, U2OS cells stably expressing a GFP-LC3 construct displayed an increase in the number of GFP-LC3 aggregates after 8–72 h of amino acids starvation with respect to cells incubated in the presence of amino acids, clearly suggesting an increase in autophagosome formation[37]. In contrast, LQ and αKG treatment strongly decreased the number of GFP-LC3 aggregates in U2OS cells, suggesting that glutaminolysis is sufficient to inactivate autophagy during amino acids restriction. In agreement with this conclusion, LQ and αKG treatments were also sufficient to increase the expression of p62 and to decrease the formation of LC3II (Fig. 4b,c), indicating a decrease in autophagy[37]. We also evaluated the autophagic flux using chloroquine (CQ) to trap the formation of autophagosomes. Whereas the addition of CQ to amino acid-starved cells increased GFP-LC3 punctate and the levels of LC3II, LQ or αKG treatments were able to reduce GFP-LC3 punctate, to reduce the levels of LC3II and to increase the levels of p62 even in the presence of CQ (Supplementary Fig. 4A–D), suggesting that indeed glutaminolysis reduced the autophagic flux. Finally, we also determined autophagy activation through the analysis of autophagy-related vesicles by transmission electron microscopy. While cells exposed to amino acid starvation for 72 h displayed an increase in the autophagy-related vesicles, the activation of glutaminolysis upon LQ treatment blocked the formation of those vesicles (Fig. 4d), again suggesting an inhibition of autophagy. Thus, the apoptotic cell death induced by the activation of glutaminolysis in the absence of amino acids correlated with an inhibition of autophagy.

To elucidate the role of mTORC1 on the blockage of autophagy by glutaminolysis, we inhibited mTORC1 pathway using rapamycin. As shown in Fig. 4a,b and Supplementary Fig. 4A–C, the inhibition of mTORC1 using rapamycin prevented the

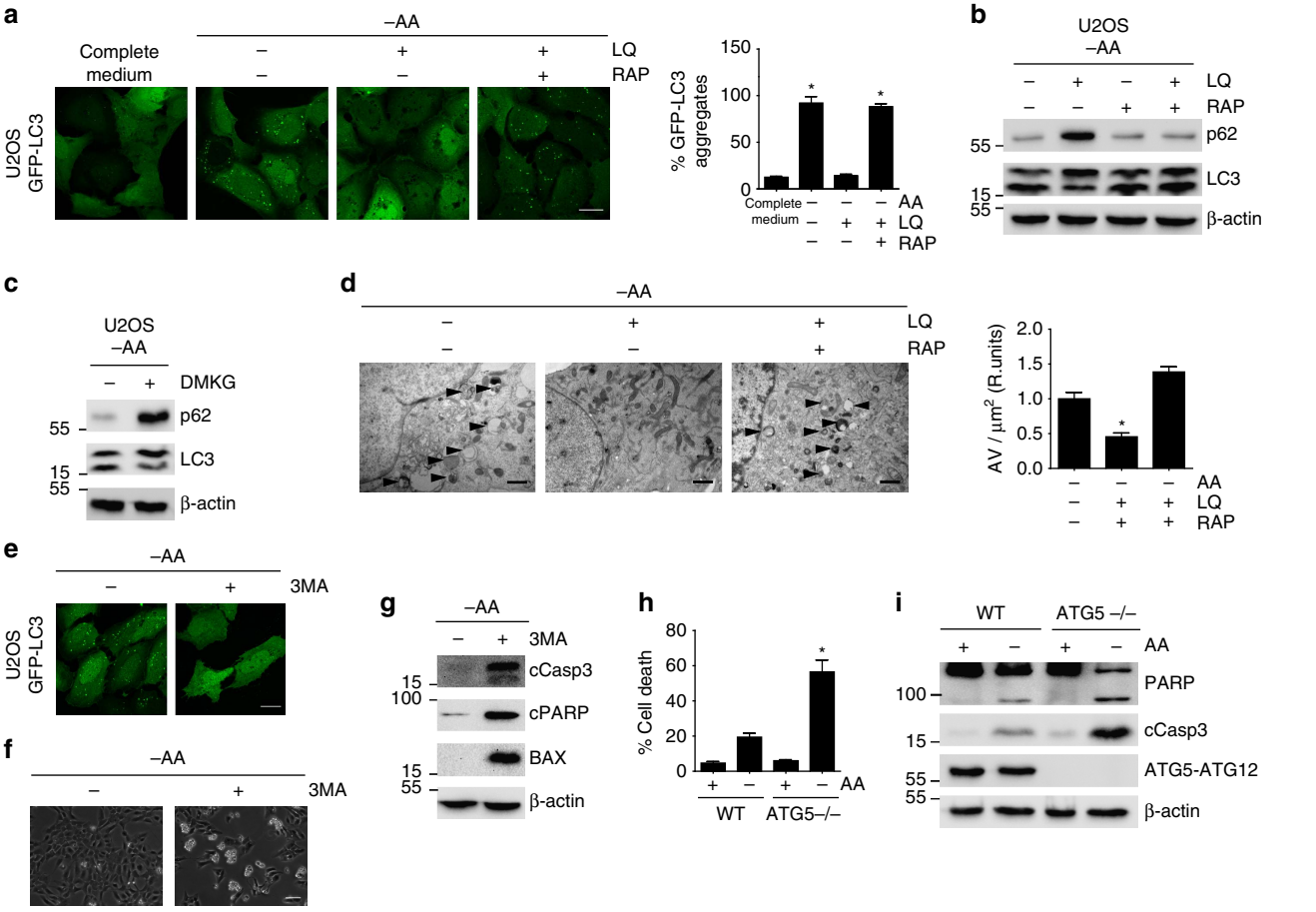


Figure 4 | Glutaminolysis activated cells showed an mTORC1 dependent inhibition of autophagy during amino acid restriction. (**a**) GFP-LC3 expressing U2OS cells were starved for amino acids in the presence or absence of LQ and RAP for 72 h as indicated. Autophagosome formation upon GFP-LC3 aggregation was determined (left panel) and quantified (right panel) using confocal microscopy. The scale bar represents 20 μm. (**b**,**c**) Western blot analysis of U2OS cells treated with LQ, DMKG and RAP as indicated to determine the levels of p62 and LC3II after 72 h. (**d**) Transmission electron microscopy (TEM) images of U2OS cells starved for amino acid in the presence or absence of LQ and RAP after 72 h. The number of autophagy-related vesicles per μm^2 was quantified for each indicated condition. The scale bar represents 1 μm. (**e**) GFP-LC3 expressing U2OS cells were starved for amino acids in the presence or absence of 3MA (5 mM) during 72 h. Autophagosome formation upon GFP-LC3 aggregation was determined using confocal microscopy. The scale bar represents 20 μm. (**f**,**g**) Representative microscopy image (**f**) and western blot analysis of apoptotic markers (**g**) in U2OS cells upon 3MA treatment during 72 h as indicated. The scale bar represents 100 μm. (**h**,**i**) WT and ATG5 −/− MEFs were incubated either in the presence (+AA) or the absence (−AA) of amino acids (+AA) for 24 h. Cell viability using trypan blue exclusion assay (**h**) and western blot analysis of apoptotic markers (**i**) are shown. Graphs show mean values ± s.e.m. ($n = 3$). *$P < 0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni).

LQ-mediated inhibition of autophagy flux, as determined by the increasing number of GFP-LC3 aggregates, the decreasing levels of p62 protein and the increasing formation of LC3II. Furthermore, the inhibition of mTORC1 using rapamycin also blocked the capacity of glutaminolysis to reduce the number of autophagy-related vesicles (Fig. 4d). Similar results were observed upon the genetic inhibition of mTORC1 using an siRNA that efficiently silenced Raptor protein. As shown in Supplementary Fig. 4E,F, Raptor (but not Rictor) depletion blocked the inhibition of autophagy by glutaminolysis, as assessed by the increasing levels of the GFP-LC3 aggregates and the decreasing levels of p62. Finally, to confirm that the glutaminolitic flux inhibits autophagy, we inhibited glutaminolysis using either DON or BPTES, and using an siRNA that efficiently silenced GLS1. In all the cases, the inhibition of GLS prevented the inhibition of autophagy by LQ treatment, assessed by the decrease of GFP-LC3 aggregates, the decrease in p62 levels and the increase in LC3II (Supplementary Fig. 4G–I). All those results confirmed that the capacity of long-term LQ treatment to inhibit autophagy required glutaminolysis and the activation of mTORC1.

Next, we wanted to investigate whether the inhibition of autophagy mediated by the activation of glutaminolysis/mTORC1 plays a mechanistic role in the induction of apoptosis during amino acid restriction. For this purpose, we first investigated whether autophagy is necessary to sustain cell viability upon nutrient restriction. Hence, we inhibited autophagy pharmacologically using 3-methyladenine (3MA) during amino acid withdrawal. 3MA treatment efficiently inhibited autophagy in amino acid-starved cells, decreasing the formation of GFP-LC3 aggregates (Fig. 4e), and induced apoptotic cell death as determined by the levels of cleaved caspase 3, cleaved PARP and BAX (Fig. 4f,g). Similarly, the inhibition of autophagy using CQ, also induced apoptotic cell death in amino acid-restricted cells (Supplementary Fig. 4J,K). These results confirmed that autophagy is necessary to sustain cell viability in conditions of amino acid restriction. We confirmed the results obtained with 3MA and CQ using ATG5 −/− MEFS and ATG5 knock down in U2OS cells. The ablation/downregulation of ATG5 prevented the capacity of the cells to survive upon amino acid withdrawal (Fig. 4h,i and Supplementary Fig. 5C).

This conclusion led us to investigate whether autophagy inhibition is the mechanistic link between the activation of glutaminolysis/mTORC1 during amino acid restriction and apoptosis.

Autophagy mediated cell survival upon rapamycin treatment. To elucidate if autophagy inhibition is the mechanistic link between the activation of glutaminolysis/mTORC1 and apoptosis during amino acid restriction, we tested whether the inhibition of autophagy prevents the rapamycin-dependent restoration of cell viability upon LQ treatment. The treatment of cells with 3MA was sufficient to inhibit autophagy in rapamycin-treated cells (Fig. 5a). Importantly, the inhibition of autophagy using 3MA or CQ also prevented the rapamycin-mediated inhibition of apoptosis in glutaminolysis-activated cells, as determined by trypan blue exclusion assay (Fig. 5b,c) and apoptotic markers such as cleaved caspase 3, cleaved PARP and BAX (Fig. 5d and Supplementary Fig. 5A), while no reactivation of mTORC1 was detected. Similarly, 3MA treatment completely abolished the capacity of rapamycin to restore colony number in a clonogenic assay (Fig. 5e,f). These results were confirmed using ATG5 knock down in U2OS cells and ATG5 −/− MEFs, in which the impairment of autophagy completely abolished the capacity of rapamycin to promote cell survival during amino acids starvation (Fig. 5g,h and Supplementary Fig. 5C–E). As expected, in ATG5 −/− MEFs, neither LQ treatment nor rapamycin modulated autophagy, as assessed by the levels of p62, which remained high due to the inactivation of autophagy (Supplementary Fig. 5B). All these results confirmed that the ability of rapamycin to promote apoptosis resistance necessarily requires autophagy re-activation, confirming that the mechanism of glutaminolysis-induced apoptosis is mediated by autophagy inhibition.

p62 mediated caspase 8 activation and apoptosis induction. While the previous results strongly suggested that mTORC1 inhibition prevented apoptotic cell death in an autophagy-dependent manner, we wanted to elucidate the precise molecular mechanism of apoptosis induction resulting from the unbalanced activation of mTORC1. The contribution of p62 to the activation of caspase 8, caspase 3 and apoptosis under certain stress conditions has been described previously[38–40]. Indeed, the interaction between p62 and caspase 8 has been reported to activate caspase pathway and apoptosis[41]. p62 levels are normally downregulated in amino acid-restricted conditions due to the activation of autophagy[42]. However, the activation of glutaminolysis/mTORC1

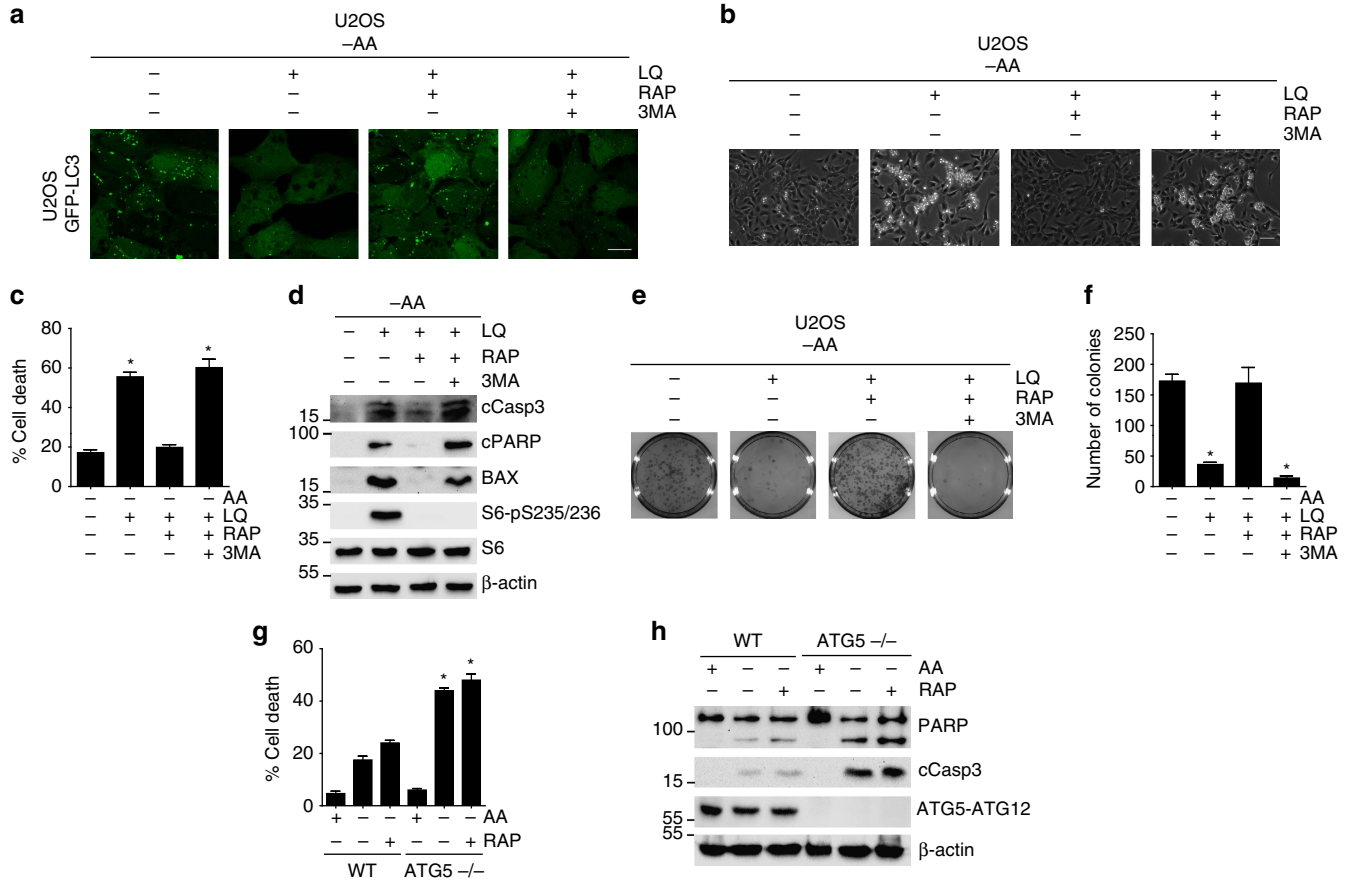


Figure 5 | Autophagy was necessary for the ability of rapamycin treatment to prevent glutaminolysis and mTORC1 induced apoptosis. (**a**) GFP-LC3 expressing U2OS cells were starved for amino acids in the presence or absence of LQ, RAP and 3MA for 72 h as indicated. Autophagosome formation upon GFP-LC3 aggregation was determined using confocal microscopy. The scale bar represents 20 μm. (**b**) U2OS cells were starved for all the amino acids in the presence or absence of LQ, RAP and 3MA for 72 h as indicated. A representative microscopy image of the cells for the indicated conditions is shown. The scale bar represents 100 μm. (**c**) Percentage of cell death as estimated using trypan blue exclusion assay in U2OS treated as in **b**. (**d**) Western blot analysis of apoptotic markers and mTORC1 downstream targets was assessed for U2OS cells treated as in **b**. (**e**,**f**) Clonogenic assay of U2OS cells treated as in **b** (**e**). The number of colonies in three independent experiments was quantified (**f**). (**g**,**h**) WT and ATG5 −/− MEFs were incubated either in the presence (+AA) or the absence (−AA) of amino acids (+AA) and rapamycin as indicated for 24 h. Cell viability using trypan blue exclusion assay (**g**) and western blot analysis of apoptotic markers (**h**) are shown. Graphs show mean values ± s.e.m. ($n=3$). *$P<0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni).

clearly sustained high levels of p62 in amino acid-restrictive conditions (Figs 4b,c and 6a). Moreover, the anti-apoptotic capacity of rapamycin correlated with its ability to reduce p62 levels (Fig. 4b). Finally, the results shown in Figs 2a and 3d demonstrated that the activation of mTORC1 during nutrient restriction activated caspase 3 and caspase 8, but it did not affect caspase 9 activation. Thus, we decided to investigate whether p62 plays a mechanistic role in mTORC1-mediated apoptosis induction. Supporting this hypothesis, we first observed that silencing p62 (using siRNA) was sufficient to prevent the activation of apoptosis mediated by LQ treatment, as determined by caspase 8 and PARP cleavage (Fig. 6a). It is noteworthy that, despite the role assigned to p62 in the activation of mTORC1 (ref. 43), silencing p62 did not affect the LQ-induced activation of mTORC1 (Fig. 6a), which placed p62 downstream of mTORC1 in the glutaminolysis-induced apoptosis. Conversely, the upregulation (exogenous overexpression) of p62 was sufficient to strongly increase cell death and to activate the cleavage of caspase 8, caspase 3 and PARP specifically in cells incubated in the absence of amino acids, but to a much lesser extent in amino acid fed cells (Fig. 6b,c). Confirming the specific role p62 in the activation of caspase 8 and caspase 3, p62 upregulation did not increase the cleavage of caspase 9 (Fig. 6b). Again, the overexpression of p62 did not affect the inactivation of mTORC1 during amino acid starvation (Fig. 6b), confirming that in our conditions p62 operates downstream of mTORC1. In addition, we corroborated that the upregulation of p62 induced its interaction with caspase 8 specifically when cells are incubated in the absence of amino acids. As shown in Fig. 6d, endogenous caspase 8 co-immunoprocipitated with p62-HA only when cells where incubated in the absence of amino acids. These results strongly suggest that the abnormally high levels of p62 during amino acid restriction are sufficient to promote the interaction of p62 with caspase 8 to induce the cleavage of caspase 8. These results sustain a model in which the unbalanced activation of glutaminolysis inhibits autophagy in an mTORC1-dependent manner. Autophagy inhibition induces high levels of p62, which in turn promotes the activation of caspase 8 and apoptosis upon amino acid imbalance (Fig. 6e).

Discussion

The results presented herein propose a complete molecular mechanism to explain how the activation of glutaminolysis in the absence of other amino acids induces an unbalanced activation of mTORC1, which promotes apoptosis upon amino acid deprivation. This unprecedented function of both glutamine metabolism and mTORC1 (two well-known pro-proliferative inducers) as activators of cell death in tumour cells place both elements with a potential tumour suppressor functionality that could be exploited in therapy. We observed that the addition of glutamine and leucine at similar concentrations than used in a complete culture medium to amino acid-starved cells (what we called 'LQ treatment') promoted the activation of apoptotic cell death through glutaminolysis, as the inhibition of this process abrogated this cell death induction. The unexpected role of glutaminolysis as a cell death inducing mechanism during nutrient restriction also pointed at the importance of nutritional balance in the control of cancer cell viability and the potential use of this metabolic disequilibrium to identify new metabolic addictions. Further sustaining this concept, previous reports showed that increasing intracellular αKG levels induce apoptosis *in vivo*, although no clear mechanism was provided[44,45]. On the other hand, a recent report showed that glutaminolysis is crucial

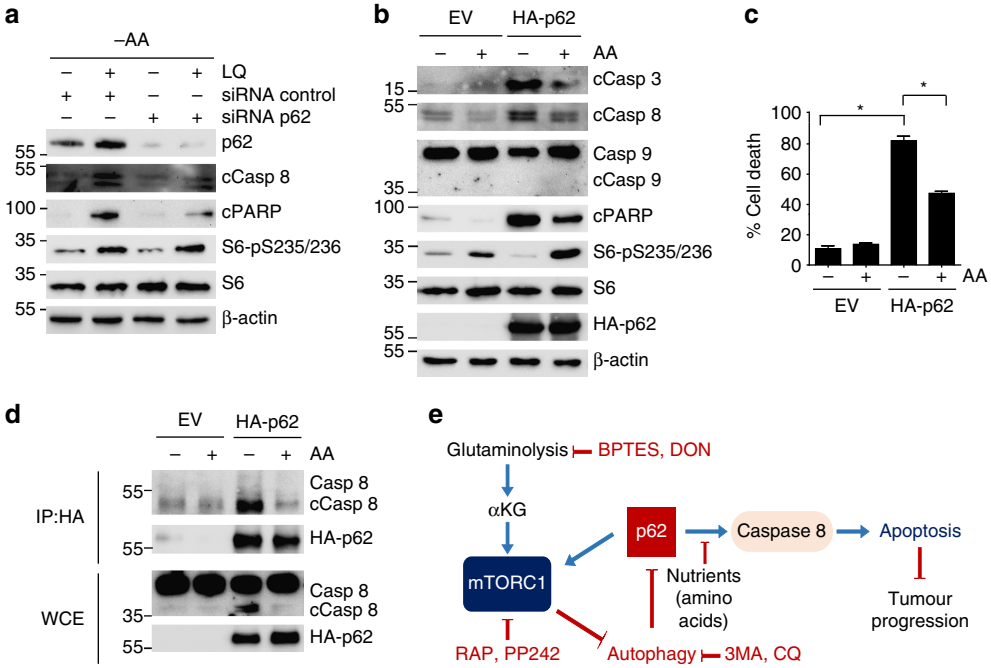


Figure 6 | p62 interacts with and activates caspase 8 and apoptosis. (**a**) U2OS cells were transfected either with a non-targeting siRNA (control) or siRNA against p62. Then cells were treated with LQ for 72 h. The activation of apoptotic markers and mTORC1 downstream targets were assessed by western blot analysis. (**b**,**c**) U2OS cells were transfected with HA-p62 for 24 h and then incubated in the presence or the absence of all the amino acids for 48 h as indicated. The expression of apoptotic markers and mTORC1 downstream targets were assessed by western blot (**b**), and cell viability was estimated using trypan blue exclusion assay (**c**). Graphs show mean values ± s.e.m. ($n=3$). *$P<0.05$ (Anova *post hoc* Bonferroni). (**d**) U2OS cells were transfected with HA-p62 and the interaction of HA-p62 with endogenous caspase 8 was evaluated by immunoprecipitation upon amino acid starvation (− AA) or amino acid sufficiency (+ AA). The co-precipitation of bot HA-p62 and caspase 8 was determined by western blot analysis. (**e**) Working model summarizing the results obtained in this work.

for the induction of ferroptosis, a non-apoptotic type of cell death[46].

As we previously described, glutaminolysis activates mTORC1 in a short-term setting[14]. Now, we have corroborated this observation in a long-term setting, showing that the activation of glutaminolysis or its end-up product αKG maintain the activity of mTORC1 for 72 h at least, which correlated with the activation of apoptosis. Strikingly, the inhibition of mTORC1 promoted cell survival upon amino acid starvation. Regarding this observation, it is important to mention here that an abnormally high activity of mTORC1 in nutrient limiting conditions is a stressful situation that many tumour cells (particularly solid tumours) are subjected to, as mTORC1 is aberrantly activated in 80% of human cancer, and the tumour environment is restrictive *per se*[3,8]. According to our results, the addition of rapamycin in these conditions constitutes an opportunity for the cancer cell to resist apoptosis. Indeed, this anti-apoptotic effect of rapamycin might explain, at least in part, the lack of efficacy observed in patients treated with mTORC1 inhibitors: mTORC1 inhibition in patients will indeed restrict tumour growth, but at the same time allows tumour survival and apoptosis resistance, which might lead to an increase in therapy resistance. A number of reports suggest that one of the reasons to explain the limited efficacy of rapamycin to target tumour growth is the specificity of rapamycin to target mTORC1 and not mTORC2 (refs 47–50). As a result, dual inhibitors of both complexes have been developed in the last years. However, we observed that a double inhibitor of mTORC1/mTORC2 (PP242) also promoted cell survival in these conditions, implying that a double mTORC1/mTORC2 inhibition might present similar problems of apoptosis resistance in patients.

In our study, we have dissected the mechanism that promotes cell death by the unbalanced activation of mTORC1 induced by glutaminolysis in the absence of amino acids. Thus, we tested the potential role of UPR, ER stress and autophagy, all processes related with apoptosis and mTORC1 activation[1,2,8,15,16,18,24,29,30]. We observed that none of the tested markers of UPR and ER stress were affected in these conditions. By contrast, the glutaminolysis-mediated activation of mTORC1 inhibited autophagy, a process crucial for the survival of the cells upon nutrient deprivation. Indeed, the inhibition of autophagy was sufficient to induce cell death. We also demonstrated that rapamycin requires autophagy to promote cell survival in glutaminolysis activated cells. Finally, we observed that autophagy-dependent reduction of p62 levels during amino acid withdrawal is a necessary step to prevent apoptosis. Hence, any tested condition that induced high levels of p62 during amino acid restriction (LQ treatment, DMKG treatment, 3MA treatment, ATG5 −/−, p62 overexpression) led to the activation of apoptosis. Therefore, this upregulation of p62 during nutrient restriction seems to be the ultimate mechanism detected by the cell to recognize an anomalous activation of cell growth signalling in restrictive conditions, and that situation prompts the cell to undergo apoptosis. This model (Fig. 6e) was corroborated by the direct interaction of p62 with cleaved caspase 8, a mechanism that has been previously described to activate apoptosis in other stressful circumstances[38–41]. However, the physiological and biochemical control of the interaction between p62 and caspase 8 needs further investigation. Mainly, how amino acid sufficiency prevents this interaction is a question that remains to be answered. Interestingly, the overexpression of p62 in conditions of amino acid sufficiency led to a higher activation of mTORC1, compared to cells expressing normal levels of p62 (Fig. 6b). This corroborates the partial role of p62 in the activation of mTORC1, as described elsewhere[43,51]. This evidence highlights the dual role of p62 either promoting cell growth through mTORC1 pathway or acting as an apoptotic signal depending on the presence or absence of amino acids.

Altogether, these results points towards autophagy as an 'addiction' in rapamycin-treated tumours, and therefore highlight the potential of autophagy as a therapeutic target to overcome rapamycin-resistant problems in tumour therapy[8,52]. Some clinical trials using the inhibition of both mTORC1 and autophagy have already shown promising results[53,54]. Here, we propose a complete molecular mechanism highlighting the functionality of mTORC1 not only as a major tumour promoter as it has been extensively characterized, but also exhibiting tumour suppressor features during nutrient restrictive conditions. Our results provide with a molecular explanation for the modest results obtained when mTOR inhibitors are used as anti-tumour therapy, as rapamycin treatment promotes survival during nutrient-restricted conditions. Discontinuation of the treatment will be then followed by a relapsed growth of tumour cells that resisted apoptosis induction. In this context, other independent reports support the notion that the inhibition of mTORC1 promotes malignancy in solid tumours. Indeed, Mikaelian *et al.* reported that mTORC1 inhibition promotes the epithelial-mesenchymal transition, increasing the migration of cancer cells[55]. In addition, recently Palm *et al.*[56] observed that the inhibition of mTORC1 increases the use of extracellular sources of nutrients, thus, sustaining the growth of cancer cells exposed to nutrient-restricted conditions. Finally, the results here exposed unveil both the crucial role played by autophagy and p62 in the anti-apoptotic effect of rapamycin and their potential use as therapeutic co-targets in rapamycin therapies.

Methods

Reagents and antibodies. Antibodies against mTOR (#2983, dilution 1:150), S6 (#2217, dilution 1:1,000), phospho-S6 (Ser235/236) (#4856, dilution 1:1,000), S6K (#2708, dilution 1:1,000), phospho-S6K(T389) (#9205, dilution 1:1,000), 4EBP1 (#9452, dilution 1:1,000), phospho-4EBP1(T37/46) (#2855, dilution 1:1,000), AKT (#4691, dilution 1:1,000), phospho-AKT(Ser473) (#4060, dilution 1:1,000), p62 (#5114, dilution 1:1,000), LC3 AB (#12741, dilution 1:1,000), β-actin (#4967, dilution 1:1,000), RAPTOR (#2280, dilution 1:1,000), RICTOR (#2140, dilution 1:1,000), cleaved caspase 3 (#9664, dilution 1:1,000), cleaved PARP (#5625, dilution 1:1,000), Bax (#5023, dilution 1:1,000), caspase 8 (#9746, dilution 1:1,000), caspase 9 (#9508, dilution 1:1,000), ATG5 (#12994, dilution 1:1,000), TNF-α (#3707, dilution 1:1,000), FasL (#4273, dilution 1:1,000), cytocrhome c (#4272, dilution 1:1,000), TSC2 (#4308, dilution 1:1,000) and Cox4 (#4850, dilution 1:1,000) were obtained from Cell Signaling Technology. Antibodies against CD63 (SAB4700215, dilution 1:400) and HA (H3663, dilution 1:5,000) were obtained from Sigma. Antibodies against GLS (ab93434, dilution 1:1,000) and Herpud1 (ab155778, dilution 1:1,000) were purchased from Abcam. Antibodies against Fas (sc-715, dilution 1:1,000), BiP (sc-15897, dilution 1:1,000) and Hsp90 (sc-69703, dilution 1:1,000) were obtained from Santa Cruz. Antibody against phospho-EIF2A (Ser52) (44-728G, dilution 1:1,000) was purchased from Thermo Fisher Scientific. Antibody against PDI (ADI-SPA-890, dilution 1:1,000) was obtained from Enzo Life Sciences. The secondary antibodies anti-mouse (#7076, dilution 1:1,000) and anti-rabbit (#7074, dilution 1:1,000) were obtained from Cell Signaling Technology. The apoptotic ligand FasL was kindly provided by Patrick Legembre (INSERM, Rennes, France), while TRAIL mAb (HS501) was obtained from Adipogen. The Permeable αKG (dimethyl-α-ketoglutarate), Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulphide (BPTES), Rapamycin (RAP), paraformaldehyde, violet crystal, 3MA, chloroquine (CQ), PP242 were obtained from Sigma. siRNA against GLS1, RAPTOR, RICTOR, p62, ATG5, BAX and non-targeting siRNA control were obtained from Dharmacon. EGFP-LC3 plasmid was a gift from Karla Kirkegaard (Addgene plasmid #11546). HA-p62 plasmid was a gift from Qing Zhong (Addgene plasmid #28027).

Cell culture. U2OS, HEK293A, A549 and JURKAT cells were obtained from ATTC. WT and ATG5 −/− MEFs were kindly provided by Patricia Boya (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid, Spain). GFP-LC3 expressing U2OS cells were obtained from Eyal Gottlieb (Cancer research UK, Glasgow, UK). Except for JURKAT (RPMI GIBCO), all the cells lines were grown in DMEM high glucose (4.5 g l^{-1}) (GIBCO) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Dominique Dutscher), glutamine (2 mM), penicillin (Sigma, 100 U ml^{-1}) and streptomycin (Sigma, 100 μg ml^{-1}), at 37 °C, 5% CO_2 in humidified atmosphere. Mycoplasma contamination check was carried out using the VenorGeM Kit (Minerva Biolabs GmbH, Germany). Standard starvation medium was EBSS (GIBCO) containing

4.5 g l^{-1} of glucose. The activation of glutaminolysis was performed by adding glutamine (2 mM final concentration) and leucine (0.8 mM final concentration). When indicated, DMKG was added to a final concentration of 0.2–2 mM. The different inhibitors were used concomitantly with the activation of glutaminolysis as follows: DON (40 μM), BPTES (30 μM), rapamycin (100 nM) and PP242 (100 nM).

Plasmids and siRNA transfections. The plasmid transfections were carried out using Jetpei (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 70% confluent cells were transfected with 2-3 μg of plasmid. Twenty-four hours later cells were starved in the presence or absence of LQ for 48 h more. siRNA transfections were performed using Interferin@ (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions: cells at 50% of confluence were transfected with siRNA (final concentration 10 nM) in complete medium for 48 h and then starved with different treatments for another 72 h.

All siRNAs were obtained from Dharmacon (on-target plus smartpool siRNA). Sequences of the siRNAs were as follows:

Non-targeting control (D-001810-02-05): (1) UGGUUUACAUGUCGACUAA, (2) UGGUUUACAUGUUGUGUGA, (3) UGGUUUACAUGUUUUCUGA, (4) UGGUUUACAUGUUUUCCUA; BAX (L-003308-01-0005): (1) GUGCGGA ACUGAUCAGAA, (2) ACAUGUUUUCUGACGGCAA, (3) CUGAGCAGAU CAUGAAGAC, (4) UGGGCUGGAUCCAAGACCA; ATG5 (L-004374-00-0005): (1) GGCAUUAUCCAAUUGGUUU, (2) GCAGAACCAUACUAUUUGC, (3) UGACAGAUUUGACCAGUUU, (4) ACAAAGAUGUGCUUCGAGA; p62 (L-010230-00-0005): (1) GAACAGAUGGAGUCGGAUA, (2) GCAUUGAAGUU GAUAUCGA, (3) CCACAGGGCUGAAGGAAGC, (4) GGACCCAUCUGUCUU CAAA; Raptor (L-004107-00-0010): (1) UGGCUAGUCUGUUUCGAAA, (2) CACGGAAGAUGUUCGACAA, (3) AGAAGGGCAUUACGAGAUU, (4) UGGAGAAGCGUGUCAGAUA; Rictor (L-016984-00-0010): (1) GACACAA GCACUUCGAUUA, (2) GAAGAUUUAUUGAGUCCUA, (3) GCGAGCUGAUG UAGAAUUA, (4) GGGAAUACAACUCCAAAUA; GLS (L-004548-01-0010): (1) CCUGAAGCAGUUCGAAAUA, (2) CUGAAUAUGUGCAUCGAUA, (3) AGAAAGUGGAGAUCGAAAU, (4) GCACAGACAUGGUUGGUAU.

Immunoblots. 5×10^6 JURKAT cells or 2×10^6 U2OS, A549, HEK293 cells were seeded in 10 cm plates. After the respective treatments cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitor (P8340 Sigma), inhibitors of phosphatases (P0044 and P5726 Sigma) and PMSF 1 mM. Protein quantification was performed using BCA kit (Pierce). After the electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (midi kit, Bio-Rad) with Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Finally, membranes were imaged using the ChemiDoc MP imager (Bio-Rad). Uncropped Western Blot scan is reported in Supplementary Fig. 6.

Immunoprecipitation. After the transfection with p62-HA, the cells were starved for 48 h. After two washes with cold PBS, cells were lysed with lP lysis buffer (40 mM Hepes pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.3% CHAPS, protease inhibitor cocktail P8340 Sigma and 1 mM PMSF). Protein extracts were incubated overnight at 4 °C with anti-HA magnetic beads (Pierce Anti-HA Magnetic Beads, Thermo Fisher #88836). Thereafter beads were washed twice with cold PBS and eluted with Laemmli buffer for immunoblot analysis.

Cell proliferation and cell viability. 1.2×10^5 cells were seeded for all the cell lines (U2OS, A549, HEK293A, JURKAT) and the number of viable cells was determined after 24–144 h, using the TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after the respective treatments cells were detached with trypsin/EDTA and 10 μl of the cells suspension were mixed with 10 μl trypan blue 5% solution (Bio-Rad) and analysed with the TC20 cell counter (Bio-rad). To estimate the percentage of cell death, cells were seeded at 1×10^6 in 6 cm plates and after the treatments (72–144 h), the viability and cell size was assessed with the TC20 cell counter.

Real-time PCR. The mRNAs from cells were isolated using Trisol (Invitrogen). One microgram of total mRNA was reverse transcribed using GoScript Reverse Transcription System (Promega). Real-time PCR was performed using SSO Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Specific primers for BAX (forward: CATGTTTTCTGACGGCCAACTTC; reverse: AGGGCCTTGAGCAC CAGTTT, PMM1 (forward: GACAGCTTGACACCATCCA; reverse: CGGCAAA GATCTCAAAGTCGTT) and RPL29 (forward: GGCTATCAAGGCCCTCGT AAA; reverse: CGAGCTTGCGGCTGACA) were purchased from Sigma-Aldrich.

Subcellular fractionation. 25×10^6 cells were seeded in two 25 cm plates for each condition and after the respective treatment the cells were subjected to a subcellular fractionation using the Cell Fractionation Kit (#9038) of Cell Signaling Technology, following the manufacturer's recommendations.

Flow cytometry. After treatment, cells were stained with annexin V and propidium iodide (PI) (Annexin V—early apoptosis detection kit, #6592 Cell Signaling Technology) following the manufacturer's instructions. Then, cells were analysed using BDFACS Canto BD-Biosciences flow cytometer. The analysis of the data was performed using the free software Flowing.

Confocal microscopy. 1.2×10^5 cells were grown in coverslips with the respective treatments for 72 h. Thereafter, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS during 30 min at room temperature. GFP-LC3 expressing U2OS cell lines were mounted after the fixation with Prolong containing DAPI (Invitrogen). For the co-localization experiments, after the fixation, cells were permeabilized using Triton-X 0.05% during 10 min, and then blocked with BSA 5% in PBS for 30 min. Finally, cells were incubated with the primary antibodies for 1 h at 37 °C. After three washes with PBS, the cover slide was incubated for 1 h at 37 °C with the appropriate secondary antibody (anti-rabbit Alexa488, dilution 1:400 or anti-mouse Alexa555, dilution 1:400, both from Invitrogen). Finally, coverslips were mounted with Prolong (invitrogen). Samples were imaged with a Leica Confocal microscope.

Clonogenic assay. Cell were starved in EBSS (glucose 4.5 g l^{-1}) with or without leucine/glutamine or DMKG during 72 h for U2OS and A549, and during 144 h for HEK293A. Similarly, U2OS cells were starved for amino acids, treated with LQ, RAP (100 nM) and/or 3MA (5 mM) as indicated for 72 h. After the treatment, 1.5×10^3 cells (U2OS, A549) or 3×10^4 (HEK293A) were seeded in a 3 cm plate containing complete media. After 14 days cells were fixed with paraformaldehyde 4% in PBS (30 min) and stained with violet crystal 5% for 15 min. Then, the plates were washed with water and imaged using ChemiDoc MP Imager (Bio Rad).

Transmission electron microscopy. After the respective treatment, cells were fixed for 1 h at 4 °C in 4% paraformaldehyde in PBS, washed and fixed again 1 h at room temperature in aqueous 2% osmium tetroxide in 0.2 M sodium cacodylate (pH 7.4). Dehydration was performed with ethanol (50%, 70%, 95% and absolute ethanol). Thereafter, the samples were embedded in Epon/Ethanol and evaporated overnight at room temperature. The samples were processed for ultra-microtomy according to standard procedures. Finally sample imaging was performed using a Hitachi H7650 microscope operated at − 80 KV with a camera Gatan—11 MPx.

Autophagosome formation was quantified counting the number of autophagy-related vesicles per area in several images for each condition and the data are represented as the average number of vesicles per μm^2.

Statistics. The results are expressed as a mean ± s.e.m. of at least three independent experiments. One-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison as a *post hoc* test were used to evaluate the statistical difference of the results. Statistical significance was estimated when $P < 0.05$.

Data availability. The authors declare that all the data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files and from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Bar-Peled, L. & Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* **24,** 1–7 (2014).
2. Liko, D. & Hall, M. N. mTOR in health and in sickness. *J. Mol. Med. (Berl)* **93,** 1061–1073 (2015).
3. Howell, J. J., Ricoult, S. J., Ben-Sahra, I. & Manning, B. D. A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **41,** 906–912 (2013).
4. Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22,** 169–176 (2010).
5. Sun, S. Y. mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Lett.* **340,** 1–8 (2013).
6. Chiarini, F., Evangelisti, C., McCubrey, J. A. & Martelli, A. M. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **36,** 124–135 (2015).
7. DeBerardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29,** 313–324 (2010).
8. Villar, V. H., Merhi, F., Djavaheri-Mergny, M. & Durán, R. V. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* **11,** 1198–1208 (2015).
9. Souba, W. W. Glutamine and cancer. *Ann. Surg.* **218,** 715–728 (1993).
10. Kovacevic, Z. & Morris, H. P. The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* **32,** 326–333 (1972).
11. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., Asenjo, M. & Márquez, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34,** 439–458 (2002).
12. Newsholme, E. A., Crabtree, B. & Ardawi, M. S. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci. Rep.* **5,** 393–400 (1985).

13. Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A. & Smith, T. J. Glutamate dehydrogenase: structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis. *Neurochem. Res.* **39,** 433–445 (2014).
14. Durán, R. V. *et al.* Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol. Cell* **47,** 349–358 (2012).
15. Russell, R. C., Yuan, H. X. & Guan, K. L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* **24,** 42–57 (2014).
16. Jiang, X., Overholtzer, M. & Thompson, C. B. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J. Clin. Invest.* **125,** 47–54 (2015).
17. Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40,** 280–293 (2010).
18. Meijer, A. J., Lorin, S. S., Blommaart, E. F. & Codogno, P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids* **47,** 2037–2063 (2014).
19. Fulda, S. & Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25,** 4798–4811 (2006).
20. Selvakumaran, M. *et al.* Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9,** 1791–1798 (1994).
21. Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15,** 6541–6551 (1996).
22. Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141,** 290–303 (2010).
23. Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16,** 1472–1487 (2002).
24. Young, R. M. *et al.* Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* **27,** 1115–1131 (2013).
25. Choo, A. Y. *et al.* Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol. Cell* **38,** 487–499 (2010).
26. Ng, S., Wu, Y.-T., Chen, B., Zhou, J. & Shen, H.-M. Impaired autophagy due to constitutive mTOR activation sensitizes TSC2-null cells to cell death under stress. *Autophagy* **7,** 1173–1186 (2011).
27. Hara, K. *et al.* Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110,** 177–189 (2002).
28. Kim, D. H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110,** 163–175 (2002).
29. Chevet, E., Hetz, C. & Samali, A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* **5,** 586–597 (2015).
30. Kokame, K., Agarwal, K. L., Kato, H. & Miyata, T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **275,** 32846–32853 (2000).
31. Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 81–94 (2014).
32. Noda, T. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **273,** 3963–3966 (1998).
33. Mortimore, G. E. & Schworer, C. M. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* **270,** 174–176 (1977).
34. Li, J. B. & Jefferson, L. S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *BBA—Gen. Subj.* **544,** 351–359 (1978).
35. Seglen, P. O., Grinde, B. & Solheim, A. E. Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur. J. Biochem.* **95,** 215–225 (1979).
36. Blommaart, E. F., Luiken, J. J., Blommaart, P. J., van Woerkom, G. M. & Meijer, A. J. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270,** 2320–2326 (1995).
37. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12,** 1–222 (2016).
38. Zhang, Y.-B., Gong, J.-L., Xing, T.-Y., Zheng, S.-P. & Ding, W. Autophagy protein p62/SQSTM1 is involved in HAMLET-induced cell death by modulating apotosis in U87MG cells. *Cell Death Dis.* **4,** e550 (2013).
39. Young, M. M. *et al.* Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **287,** 12455–12468 (2012).
40. Kim, E. *et al.* Activation of caspase-8 contributes to 3,3-Diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *J. Nutr.* **137,** 31–36 (2007).
41. Jin, Z. *et al.* Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* **137,** 721–735 (2009).
42. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171,** 603–614 (2005).
43. Duran, A. *et al.* p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol. Cell* **44,** 134–146 (2011).
44. Tennant, D. A. *et al.* Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. *Oncogene* **28,** 4009–4021 (2009).
45. Tennant, D. A. & Gottlieb, E. HIF prolyl hydroxylase-3 mediates alpha-ketoglutarate-induced apoptosis and tumor suppression. *J. Mol. Med. (Berl)* **88,** 839–849 (2010).
46. Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R. & Jiang, X. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis. *Mol. Cell* **59,** 298–308 (2015).
47. O'Reilly, K. E. *et al.* mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* **66,** 1500–1508 (2006).
48. Carracedo, A. *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118,** 3065–3074 (2008).
49. Chandarlapaty, S. *et al.* AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* **19,** 58–71 (2011).
50. Tabernero, J. *et al.* Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **26,** 1603–1610 (2008).
51. Linares, J. F. *et al.* Amino acid activation of mTORC1 by a PB1-domain-driven kinase complex cascade. *Cell Rep.* **12,** 1339–1352 (2015).
52. Medvetz, D., Priolo, C. & Henske, E. P. Therapeutic targeting of cellular metabolism in cells with hyperactive mTORC1: a paradigm shift. *Mol. Cancer Res.* **13,** 3–8 (2015).
53. Chi, K.-H. *et al.* Addition of rapamycin and hydroxychloroquine to metronomic chemotherapy as a second line treatment results in high salvage rates for refractory metastatic solid tumors: a pilot safety and effectiveness analysis in a small patient cohort. *Oncotarget* **6,** 16735–16745 (2015).
54. Rangwala, R. *et al.* Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* **10,** 1391–1402 (2014).
55. Mikaelian, I. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF-β-independent mechanism. *Cancer Res.* **73,** 6621–6631 (2013).
56. Palm, W. *et al.* The utilization of extracellular proteins as nutrients is suppressed by mTORC1. *Cell* **162,** 259–270 (2015).

Acknowledgements

This work was supported by funds from the following institutions: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale—INSERM, Fondation pour la Recherche Médicale, the Conseil Régional d'Aquitaine, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, SIRIC-BRIO, Institut Européen de Chimie et Biologie. We thank Vincent Pitard and Santiago Gonzalez (Flow Cytometry Platform, Université de Bordeaux, France) for technical assistance in flow cytometry experiments. MEFs WT and ATG5 −/− were kindly provided by Prof. Patricia Boya (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid, Spain). FasL was a gift from Patrick Legembre (INSERM, Rennes, France). EGFP-LC3 plasmid was a gift from Karla Kirkegaard. HA-p62 plasmid was a gift from Qing Zhong.

Author contributions

V.H.V. and R.V.D. conceived the project. V.H.V., M.B., P.V., M.P., and R.V.D. designed experiments. V.H.V., T.L.N., S.T., V.D., M.B., C.B., B.S. and M.P. performed experiments and analysed data. R.V.D. and P.S. secured funding. V.H.V. and R.V.D. wrote the manuscript. All the authors read and approved the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Villar, V. H. *et al.* mTORC1 inhibition in cancer cells protects from glutaminolysis-mediated apoptosis during nutrient limitation. *Nat. Commun.* **8,** 14124 doi: 10.1038/ncomms14124 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017