



HAL
open science

Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées

Thibaut Lefebvre

► **To cite this version:**

Thibaut Lefebvre. Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2019. Français. NNT : 2019AMIE0057 . tel-03632807

HAL Id: tel-03632807

<https://theses.hal.science/tel-03632807>

Submitted on 6 Apr 2022

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.



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Physiopathologie Humaine*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'**Université de Picardie Jules Verne**

par

Thibaut Lefebvre

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées

Soutenue le 10 décembre 2019, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M^{me} I. Van Seuning , Directeur de Recherche (DR1), Université de Lille	Président
M. B. Brassart , Maître de Conférences-HDR, Université de Reims Champagne Ardenne	Rapporteur
M^{me} M. Potier-Cartereau , Maître de Conférences-HDR Université de Tours	Rapporteur
M. C. Vandier , Professeur des Universités, Université de Tours	Examineur
M^{me} H. Ouadid-Ahidouch , Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne	Examineur
M. M. Gautier , Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne	Directeur de thèse
M^{me} I. Dhennin-Duthille , Maître de Conférences, Université de Picardie Jules Verne	Co-encadrant



REMERCIEMENTS :

En premier lieu, je tiens à remercier le Dr. Marie Potier-Cartereau, le Dr. Bertrand Brassart, le Pr. Halima Ouadid-Ahidouch, le Pr. Isabelle Van Seuningen, ainsi que le Pr. Christophe Vandier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. J'imagine que l'expertise d'un manuscrit de thèse est un exercice particulièrement chronophage et vous suis reconnaissant d'avoir accepté ce travail supplémentaire.

J'exprime de nouveau toute ma reconnaissance à l'adresse du Pr. Halima Ouadid-Ahidouch qui m'a donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire.

A mes encadrants, le Pr. Mathieu Gautier et le Dr. Isabelle Dhennin-Duthille, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour avoir supervisé mes travaux de recherche, et m'avoir apporté leur aide précieuse durant ces 3 années.

Je tenais à renouveler ma gratitude au Pr. Mathieu Gautier qui m'encadre depuis le Master 1 et m'a accompagné au cours d'une bonne partie de mon cursus universitaire.

Bien évidemment je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire, notamment : Marie-Sophie, Lucille, Ahmed, Philippe, Fred, Lise, et Alban pour leur soutien, leur professionnalisme, et les nombreux conseils qu'ils ont pu me donner.

Je remercie également chaleureusement l'ensemble des étudiants avec qui j'ai été amené à travailler : Alexia, Mehdi, Mikael, Nahla, Marianne, Jessy, Alison, Marta, Mohammed, Sylvia, Hiba, Julia et Riadh pour leur aide, leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a toujours encouragé à faire des études et apporté son soutien inconditionnel. Ainsi que ma femme, Amina, à qui je dédis ce travail de thèse et que je ne remercierais jamais assez de m'avoir tant appris, motivé et tant apporté dans tous les domaines, n7bek nmout 3alik ya rou7i !

SOMMAIRE :

GLOSSAIRE :	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE I - L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE :	16
I) Généralités sur le pancréas :	16
II) Données épidémiologiques :	17
III) Types Histologiques :	18
IV) Facteurs de risques de l'ACP :	19
V) Signes cliniques et traitements :	21
VI) Progression de l'ACP :	22
1) Lésions précancéreuses dans l'ACP :	22
2) Inflammation chronique et ACP :	24
CHAPITRE 2) LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL :	27
I) Généralité sur le microenvironnement tumoral :	27
1) Le microenvironnement, une caractéristique de la cellule cancéreuse :	27
2) La tumeur et son microenvironnement :	28
II) La réaction desmoplastique :	29
III) Composition du microenvironnement tumoral :	30
1) La composante matricielle acellulaire :	30
2) Matrice extracellulaire et cancer :	32
3) Les matrikines dans le cancer :	35
4) La composante cellulaire stromale :	37
CHAPITRE 3) LES CELLULES STELLAIRES PANCREATIQUES :	43
I) Les cellules stellaires pancréatiques dans l'ACP :	43
II) Caractérisation des CSP :	44
III) Activation des CSP :	47
1) Perte de l'état de quiescence :	48
2) Expression de l'alpha actine de muscle lisse (α -SMA) :	49
3) Acquisition d'un phénotype stellaire :	52

4) Acquisition d'un phénotype sécrétoire :	53
IV) Signalisation cellulaire dans les CSP :	54
V) Voies d'activation des CSP :	57
1) Activation par les facteurs cancéreux :	57
2) Activation par l'Hypoxie	59
3) Activation par l'inflammation chroniques et les états précancéreux :	60
VI) Communication des cellules stellaires dans le microenvironnement :	61
1) Cellules stellaires pancréatiques et matrice extracellulaire :	61
2) Cellules stellaires pancréatiques et Cellules d'ACP :	62
3) Stimulation autocrine des cellules stellaires pancréatiques :	67
VII) Hétérogénéité des CSP :	68
CHAPITRE 4) MECANISMES IONIQUES DE PROLIFERATION ET DE SURVIE	
CELLULAIRE :	70
I) La prolifération cellulaire :	70
1) Le Cycle cellulaire :	71
2) Rôle de la cycline E dans la transition G1-S :	73
3) Rôle de la CDK2 dans la transition G1-S :	74
4) Rôle des CKI dans la transition G1-S :	75
5) Rôle de PCNA dans la transition G1-S :	75
6) Le facteur p53 : gardien du génome :	77
7) Voies de signalisations mitotiques :	79
II) Survie cellulaire :	82
1) La mort cellulaire :	82
2) L'Apoptose :	83
III) Magnésium et biologie cellulaire :	88
1) Distribution cellulaire du magnésium :	88
2) Les transporteurs magnésiques :	89
3) Rôle du magnésium dans la cellule :	95
4) Magnésium et prolifération cellulaire :	98
5) Magnésium et cancer :	102
CHAPITRE 5) LE CHANZYME TRPM7 :	105
I) Généralités sur les canaux ioniques :	105
II) La famille des canaux TRP :	107
III) Le canal TRPM7 :	109

1) Structure et fonction :	109
2) Caractérisation électrophysiologique :	112
3) Le domaine kinase de TRPM7 :	113
4) Interaction avec le canal TRPM6 :	116
IV) Systèmes de régulation de l'activité du canal TRPM7 :	117
1) Systèmes de régulation physiologiques :	117
2) Régulation par les Récepteurs Tyrosine Kinase :	120
3) Modulateurs Pharmacologiques de TRPM7 :	121
V) Rôle Physiologique de TRPM7 :	123
1) TRPM7, développement embryonnaire et différenciation :	124
2) TRPM7 et cytosquelette :	125
3) TRPM7 et survie cellulaire :	126
4) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération cellulaire :	127
5) Régulation des voies de signalisation intracellulaires par TRPM7 :	129
VI) Implication de TRPM7 dans la pathologie :	131
1) TRPM7 et cancer :	131
2) TRPM7 dans les cellules stellaires :	132
OBJECTIFS	135
MATERIELS ET METHODES	139
I) Méthodes de culture cellulaire :	140
1) Lignées cellulaires:	140
A) Lignée PS-1 :	140
B) Lignée RLT-PSC :	140
C) Lignée MIA PaCa-2 :	141
2) Conditions de culture :	141
3) Conservation des lignées cellulaires :	142
4) Obtention de milieux conditionnés :	143
5) Conditions de traitements des cellules :	144
II) Techniques de Biologie Cellulaire :	146
1) Evaluation de la viabilité cellulaire par métabolisation du MTT :	146
2) Evaluation de la viabilité/mortalité cellulaire par traitement au BT :	146
3) Analyse cellulaire par cytométrie de flux :	147
A) Evaluation de la prolifération cellulaire :	148

B) Evaluation de l'apoptose cellulaire :	149
4) Evaluation de la migration cellulaire par insert de Boyden :.....	152
III) Méthodes de biologie moléculaire :.....	153
1) Transfections et ARN interférents :.....	153
2) Extraction des acides nucléiques :.....	154
3) Technique de PCR:.....	155
4) Technique de qRT-PCR :.....	156
IV) Technique d'analyse des protéines :	157
1) Western Blot :	157
A) Extraction des protéines :.....	157
B) Séparation des protéines :	158
C) Révélation des protéines :.....	159
2) Technique d'Immunofluorescence :	160
V) Méthodes d'imagerie cationique :.....	163
1) Mesure de l'entrée cationique :	163
A) Evaluation de la fluorescence calcique cytosolique :	165
B) Evaluation de la fluorescence magnésique cytosolique :.....	166
2) Evaluation de l'entrée cationique par le quench au Mn ²⁺ :.....	166
VI) Analyse statistique :.....	167
RESULTATS et DISCUSSION Partie I	168
Partie 1 : Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées :	169
I) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des CSP :.....	169
1) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :.....	169
2) Rôle du facteur p53 dans la prolifération des cellules PS-1 :.....	177
3) Implication de la voie PI3K/AKT dans la prolifération des cellules PS-1 : ..	179
4) Rôle du magnésium dans la prolifération des cellules PS-1 :.....	183
II) Rôle du canal TRPM7 dans l'activation des cellules PS-1 :.....	192
1) Rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition d'un phénotype prolifératif :	192
2) Rôle du canal TRPM7 sur l'expression de α -SMA :.....	204
CONCLUSION et PERSPECTIVES Partie I	220
1) Rôle du canal TRPM7 dans la survie des CSP :.....	222
2) Rôle du canal TRPM7 dans la migration et l'invasion des CSP :.....	225

3) Caractérisation électrophysiologique du canal TRPM7 et rôle du magnésium dans l'activation des CSP :	227
4) Rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition d'un phénotype agressif par les CSP et intégration des résultats au modèle <i>in situ</i> :	229
5) Implication du canal TRPM7 dans l'activation des CSP :	231
6) Rôle du canal TRPM7 dans la communication MET/tumeur :	232
RESULTATS et DISCUSSION Partie II	235
Partie II) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines dans les cellules d'ACP :	236
1) Effet des peptides d'élastine sur la migration et la prolifération des cellules MIA Paca-2 :	237
2) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines :	239
3) Effet des peptides d'élastine sur l'expression du canal TRPM7 et l'entrée cationique :	241
4) Effet des peptides d'élastine sur l'activité du canal TRPM7 et l'homéostasie calcique :	243
CONCLUSION et PERSPECTIVES Partie II	251
CONCLUSION GENERALE	255
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	260

LISTE DES FIGURES :

Figure 1) Anatomie du pancréas :	16
Figure 2) Données épidémiologiques : mortalité et survie du cancer pancréatique : 18	
Figure 3) Lésions précancéreuses et progression de l'ACP :	23
Figure 4) inflammation chronique et développement de l'ACP :	26
Figure 5) Les caractéristiques de la cellule cancéreuse :	27
Figure 6) Composition de la matrice extracellulaire :	32
Figure 7) Le microenvironnement et la MEC : évolution du physiologique au pathologique :	33
Figure 8) Activation des fibroblastes, fibrose et cancer :	40
Figure 9) Hétérogénéité phénotypique des CAF :	42
Figure 10) Les CSP dans le pancréas physiologique :	45
Figure 11) Caractéristiques de la CSP activée :	47
Figure 12) Voie de signalisations canonique et non-canonique du TGF- β :	52
Figure 13) Les CSP dans la réaction desmoplastique de l'ACP:	58
Figure 14) Influences des CSP sur les mécanismes de la cellule cancéreuse :	64
Figure 15) Hétérogénéité des CSP :	69
Figure 16) Cycle cellulaire et cinétique d'expression des cyclines :	73
Figure 17) Régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire :	76
Figure 18) Voie PI3K/AKT et rôle d'AKT dans la survie et la prolifération cellulaire : 80	
Figure 19) Régulation, catalyse enzymatique et cibles de GSK3 :	82
Figure 20) Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose cellulaire :	86
Figure 21) Magnésium et transporteurs magnésique dans la cellule :	94
Figure 22) Rôle du magnésium dans la signalisation cellulaire :	99
Figure 23) Implication du magnésium dans l'initiation et la progression cancéreuse :	104
Figure 24) Arbre Phylogénétique et Particularités structurales des canaux TRP : .	108
Figure 25) Caractéristiques structurales et fonctionnelles du canal TRPM7 :	110
Figure 26) Caractéristiques électrophysiologiques du canal TRPM7 :	112
Figure 27) Structure du domaine kinase de TRPM7, interaction avec un inhibiteur et réaction catalytique dépendante du magnésium :	115
Figure 28) Représentation des sites de régulation de TRPM7 et des sites de phosphorylation du canal :	116
Figure 29) Systèmes de régulations physiologiques et pharmacologiques du canal TRPM7 :	119
Figure 30) Interaction entre le canal TRPM7 et les voies de signalisation intracellulaires des RTK :	130
Figure 31) Protocole de culture cellulaire en milieu conditionné :	143
Figure 32) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux :	148
Figure 33) Evaluation de la mortalité cellulaire par cytométrie de flux :	151

Figure 34) Dispositif expérimental de migration cellulaire en insert de Boyden :.....	153
Figure 35) Structure et principe de fonctionnement de la sonde Fura-2 AM :.....	164
Figure 36) Calcul de la pente d'extinction du Fura-2 AM :	167
Figure 37) Caractérisation de la lignée PS-1 :	169
Figure 38) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :	172
Figure 39) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :	175
Figure 40) Rôle de P53 dans la prolifération des cellules PS-1 :	178
Figure 41) Rôle du canal TRPM7 sur la signalisation proliférative dans les cellules PS-1 :	179
Figure 42) Rôle de la voie PI3K/AKT dans la prolifération des cellules PS-1 :	182
Figure 43) Rôle du canal TRPM7 dans l'entrée cationique, et le maintien de l'homéostasie calcique et magnésique dans les cellules PS-1 :	184
Figure 44) Effet du magnésium sur la prolifération cellulaire dépendante de TRPM7 dans les cellules PS-1 :	186
Figure 45) Effet du magnésium sur la prolifération cellulaire induite par l'activation de la voie PI3K/AKT dans les cellules PS-1 :	191
Figure 46) Effet du traitement à l'ATRA sur l'activation des cellules PS-1:.....	194
Figure 47) Effet du traitement à l'ATRA sur la prolifération des cellules PS-1 :	196
Figure 48) Effet du traitement au milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 sur la prolifération des cellules PS-1 :	198
Figure 49) Caractérisation des cellules RLT-PSC :	200
Figure 50) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des CSP :	202
Figure 51) Rôle du canal TRPM7 sur l'expression des marqueurs de CSP par les cellules PS-1 :	205
Figure 52) Rôle du canal TRPM7 et de la voie AKT sur l'expression de α -SMA par les cellules PS-1 :	208
Figure 53) Rôle du magnésium sur l'expression de l' α SMA dépendante de TRPM7 :	210
Figure 54) Effet du traitement au MC de MIA Paca-2 sur l'expression de α -SMA :	212
Figure 55) Rôle du canal TRPM7 sur l'expression de SMA dans les cellules CSP :	213
Figure 56) Effet du TGF sur l'expression de SMA et sur la prolifération des cellules PS-1 :	215
Figure 57) Schéma récapitulatif du rôle de TRPM7 dans le maintien de l'homéostasie magnésique et la prolifération des CSP humaines activées :	221
Figure 58) Rôle du canal TRPM7 dans la survie des cellules PS-1 :	223
Figure 59) Rôle du canal TRPM7 dans la migration et l'invasion des CSP :	226
Figure 60) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération et la migration des cellules d'ACP induite par les CSP :	233
Figure 61) Effet des peptides d'élastines sur la migration et la viabilité des cellules MIA Paca-2 :	238
Figure 62) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines sur les cellules MIA Paca-2 :	240

Figure 63) Effet des peptides d'élastines sur l'expression du canal TRPM7 et l'entrée cationique dans les cellules MIA Paca-2 :	242
Figure 64) Effet des peptides d'élastines sur l'homéostasie calcique et l'activité du canal TRPM7 :	244
Figure 65) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par le peptide AG-9 dans les cellules MIA Paca-2 :	252
Figure 66) Rôle du canal TRPM7 dans l'interaction Tumeur / MET :	256

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1) Facteurs de risques de l'ACP :	20
Tableau 2) Effets des peptides d'élastines sur les mécanismes cellulaires dans les cellules saines et cancéreuses :	36
Tableau 3) Les principaux transporteurs magnésiques et leurs caractéristiques : ...	90
Tableau 4) Traitements appliqués aux cellules.....	145
Tableau 5) Séquences des siRNA utilisés :	153
Tableau 6) Primers utilisés en PCR :	155
Tableau 7) Solutions tampons utilisées en Western Blot :	159
Tableau 8) Liste des anticorps primaires utilisés en WB et IF :	161
Tableau 9) : Composition des solutions et milieux d'imagerie utilisés.	165

GLOSSAIRE :

ACP : adénocarcinome canalaire
pancréatique

AIF : apoptosis inducing factor

AMPc : Adénosine monophosphate 3',
5'cyclique

ANOVA : analyse of variance

AP-1 : activator protein 1

APAF-1 : apoptosis proteine activating
factor 1

APE1 : Apurinic Apyrimidic
Endonuclease type 1

ARC : arachidonic acid–regulated
calcium channel

ATP : adenosine triphosphate

ATRA : All Trans Retinoic Acid

AV : annexin V

BET : bromure d'éthidium

BH : bcl-2 homology

BiP : binding immunoglobuline protein

BRCA1 : breast cancer 1

BSA : bovine serum albumin

BT : bleu trypan

CAF : cancer associated fibroblasts

CAM : cancer associated macrophage

CCP : cellules cancéreuses
pancréatiques

CCR : coiled-coil region

CDK : cyclin-dependent kinase

CDKN1 : cyclin dependent kinase
inhibitor 1

CHAK1 : chAnnel kinase 1

CHC : carcinoma hépatocellulaire

CHOP : C/EBP homologous protein

CKI : cyclin-dependent kinase inhibitor

CMLV : cellule musculaire lisse
vasculaire

CNNM : member of the cyclin M family

COX-2 : cyclooxygenase 2

CRAC : calcium release-activated
channels

CREB : cAMP response element-
binding protein

CS : cellule stellaire

CSH : cellule stellaire pancréatique

CSP : Cellule Stellaire Pancréatique

CTGF : connectif tissue growth Factor

CXCL1 : chemokine C-X-C motif ligand
1

DAPI : di-aminido phenylindol

DMEM-F12 : dulbecco modified eagle
medium/ nutrient mixture F-12 ham

DMSO : dimethyl sulfoxide

dNTP : desoxy nucleotides
triphosphates

DR4 : death receptor 4

E2F : eukaryotic elongation factor

EBP : elastin-derived peptide

EDTA : ethylenediaminetetraacetic
acid

eEF2 : eukaryotic translation elongation factor2

EGCG : épigallocatechine-3-o-gallate

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid

EMT : transition épithelio-mésenchymateuse

ER : estrogen receptor

ERC : elastin receptor complex

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FACIT : Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices

FAK : focal adhesion kinase

FAP : Fibroblast Activating Protein

FGF : fibroblasts growth Factor les

FITC : fluorescein isothiocyanate

FN : fibronectin

FSP-1 : fibroblast Specific Protein 1

G1 : gap 1

GADD45 : growth arrest and DNA dammage-inducible protein 45

GAG : glycoaminoglycane

GALT : gut associated lymphoid tissue

GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GPDH : glycerol-3-phosphate dehydrogenase

GSK3 : Glycogen synthase kinase

GST : glutathion S-transferase

GTP : guanosine triphosphate

HA : hyaluronic acid

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HGF : hepatocyte growth factor

HIF-1 : hypoxia inducible Factor 1

HS : heparanesulfate

HSP : hepatic Stellate Cells

Hsp90 : heat shock protein 90

IAP : inhibitor of apoptosis protein

IC50 : inhibitory concentration 50

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN- γ : interferon gamma

IL : interleukine

INK4A : inhibitor of cyclin dependant kinase 4A

IP : iodure de propidium

IPMN : intraductal papillary mucinous neoplasms

JAK : janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinases

KO : knock out

K-ras : kirsten rat sarcoma

LOX : lysyl oxydase

LPS : lipo-polysaccharide

M : mitosis

magNUM : magnesium nucleotide regulated metal ion current

MagT1 : Magnesium Transporteur 1

MAPK : mitogen activated protein kinases

MC : milieu conditionné

MCN : mucinouscysticneoplasms

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

MDM-2 : Murine Double Minute 2

MEC : matrice extracellulaire

MET : microenvironnement tumoral

MHC : myosine heavy chain

MIC : magnesium inhibited cationic

MLCK : myosin light-chain kinase

MMM : membrane magnesium mitosis

MMP : matrix metalloproteinase

MRS2 : mitochondrial RNAsplicing 2

MSC : Mesenchymal Stem Cell

mTOR : mammalian target of rapamycin

MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MYH11 : myosine-11

MYIIA : myosine II A

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NFAT : nuclear factor of activated T-cells

NF κ B : nuclear factor kappa B

NGA : neural-glial antigen

NK : natural killer

OST : oligosaccharyltransferase

PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasias

PARP : poly ADP ribose polymerase

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PCR : polymerase chain reaction

PDGF : platelet-derived-growth-Factor

PDPN : podoplanine

PET : polyéthylène-téréphtalate

PFA : paraformaldéhyde

PG : polygalacturonane

PI3K : phosphatidyl inositol triphosphate kinase

PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphatidyl inositols (3,4,5) triphosphates

PKA : protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLC : phospholipase C

POSTN : périostine

PPAR- γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

qPCR : PCR quantitative

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Ras : rat sarcoma

RB : retinoblastoma

RCPG : recepteur couplés aux protéines G

RD : reaction desmoplastique

RECK : reversion Inducing cysteine rich protein with kazal motif

RhoA : ras homolog family member A

ROC : receptor-operated channel

ROCK : rho-associated protein kinase

ROS : reactive oxygen species

RPSA : ribosomal protein SA

RT : retro-transcription

RTK : récepteur tyrosine kinase

S1P : sphingosine 1 Phosphate

SBE : smad binding element

SDF-1 : stromal-cell derived factor 1

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEM : standard error of the mean

Ser : residus serine

siRNA : small interferent ribonucleic acid

SLC4A1 : solute carrier family 41 member 1

Smad : small mothers against decapentaplegic

SMOC : second messenger-operated channels

SOC : store-operated channel

STAT : signal transducer and activator of transcription

STIM : stromal interaction molecule

TEA : triethylamine

TF : transcription factor

TGFβ : transforming growth Factor β

Thr : residu threonine

TIMP : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

TNF : tumor necrosis factor

TNFR : tumor necrosis factor receptor

TRAIL : TNFR related apoptosis inducing ligand

Treg : lymphocyte T régulateur

TRP : transient receptor potential

TRPA : TRP akyrin

TRPC : TRP canonical

TRPM : TRP melastatin

TRPM7 : transient receptor potential melastatin-related 7

TRPML : TRP mucolipin

TRPP : TRP polycystin

TRPV : TRP vanilloid

uPA : urokinase plasminogen activator

VCAM : Vascular cell adhesion protein 1

VEGF : vascular endothelial growth factor

VOC : voltage-operated channels

WAF : wound-healing-associated fibroblast

WNT : wingless Int-1

XPB : xeroderma pigmentosum type B

α-SMA : alpha smooth muscle actin

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I - L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE :

I) Généralités sur le pancréas :

Le pancréas est un organe situé en position rétropéritonéale en contact direct avec la veine cave inférieure et l'aorte. Il s'agit de l'organe glandulaire le plus volumineux de l'organisme (jusqu'à 100 g) et assure à la fois des fonctions endocrines impliquées dans la régulation de la glycémie, et des fonctions exocrines de sécrétion des enzymes digestives et des ions bicarbonates. Bien qu'étant une glande mixte, 80% de la masse de cet organe est dédiée à la fonction exocrine.

La glande pancréatique est constituée de 4 parties : la tête, logée sous l'estomac et devant l'aorte ; le col du pancréas situé devant la veine porte ; le corps se prolongeant sous la partie basse de l'estomac ; et la queue du pancréas située en position latérale droite, proche de la rate.

La dualité fonctionnelle du pancréas est due à la présence de deux types cellulaires distincts. En effet, les cellules endocrines sont regroupées au sein d'îlots de Langerhans alors que les cellules à activité exocrine forment des acini qui déversent leurs sécrétions dans les canaux pancréatiques (Figure 1).

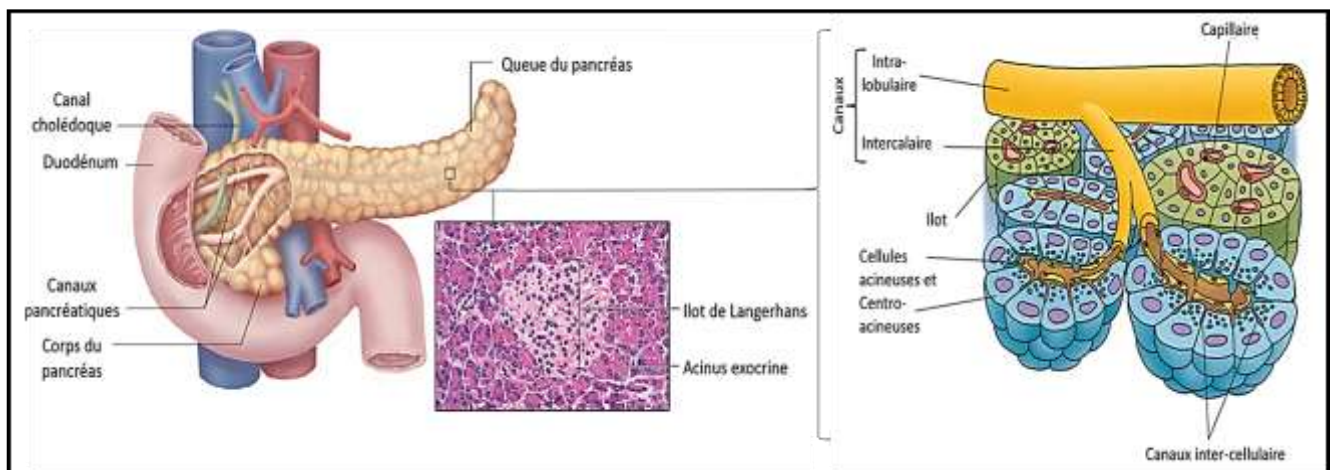


Figure 1) Anatomie du pancréas :

L'anatomie générale du pancréas est représentée à gauche avec une coupe histologique de tissu pancréatique montrant la séparation entre les fonctions endocrine et exocrine. Le schéma de droite fait apparaître les acini exocrines et les cellules épithéliales sécrétoires.

Modifié d'après le site Eurocytology (<https://www.eurocytology.eu/en/course/418>) et le livre **BIO202 : Human Anatomy and Physiology**.

L'activité endocrine issue des îlots de Langerhans est majoritairement représentée par les cellules β -pancréatiques sécrétant l'insuline et représentant entre 65 et 80% de l'îlot. Les cellules α -pancréatiques sont impliquées dans la sécrétion de glucagon et les cellules δ secrètent la somatostatine.

Les cellules acinaires du pancréas exocrine synthétisent, et stockent des enzymes actives telles que la lipase ou l'amylase pancréatique, mais également des enzymes sous forme inactive comme le zymogène ou le trypsinogène. Environ 2000 ml de solution iso-osmotique alcaline est sécrétée quotidiennement par le pancréas dans le duodénum afin de tamponner l'acidité des sucs gastriques [Ogami et Otsuki 1998].

II) Données épidémiologiques :

Chaque année le cancer est responsable de près de 8,2 millions de décès dans le monde. Et les prédictions anticipent une augmentation de l'incidence des cancers de près de 70% d'ici 2030. Les différents types histologiques de cancers sont classés en fonction des paramètres d'incidence et de mortalité. Pour la plupart des cancers, comme le cancer pulmonaire, l'incidence et la mortalité sont proches, néanmoins pour d'autres cancers, comme le cancer du pancréas, il existe un écart important entre les deux classements. Le cancer du pancréas possède une incidence relativement faible mais il est caractérisé par un taux de mortalité parmi les plus élevés, ce qui fait de lui la 7^{ème} cause de décès par cancer à l'échelle mondiale (Figure 2). Cet écart important entre incidence et mortalité traduit la grande agressivité du cancer pancréatique et fait de lui le cancer possédant le pronostic le plus sombre, tous cancers confondus [Yadav et al. 2013].

Les données épidémiologiques issues de GLOBOCAN (Global Cancer Observatory ; <https://gco.iarc.fr/>) estiment à 330 000 le nombre de décès et à 337 900 le nombre de nouveaux cas de cancers pancréatiques dans le monde pour l'année 2012. Environ 7000 cancers du pancréas sont diagnostiqués par an en France, et la pathologie est responsable de la mort de 4300 personnes chaque année (tous sexes confondus).

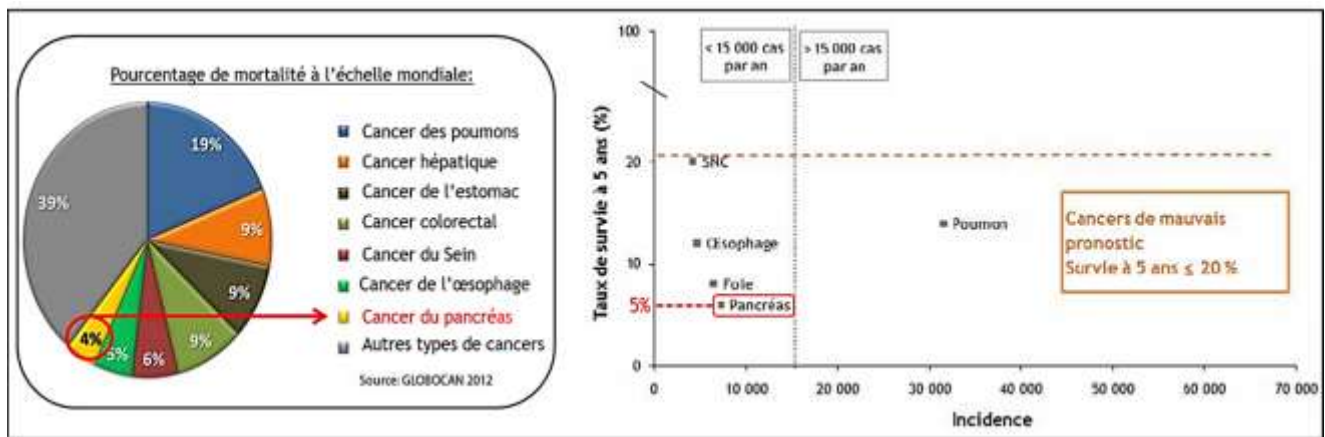


Figure 2) Données épidémiologiques : mortalité et survie du cancer pancréatique :

En dépit d'une incidence faible, le cancer pancréatique possède le taux de survie le plus faible en comparaison avec les autres cancers.

D'après GLOBOCAN (<https://gco.iarc.fr/>).

L'âge moyen du diagnostic est estimé à 71 ans pour les hommes et 78 ans pour les femmes, ce qui fait du cancer pancréatique un cancer de la personne âgée [Yadav *et al.* 2013]. La survie moyenne après diagnostic d'un cancer pancréatique est de 6 mois et son taux de survie à 5 ans est estimé entre 3 et 5% (Figure 2), il s'agit du cancer présentant le taux de survie le plus faible [Vincent *et al.* 2011 ; Siegel *et al.* 2012 ; Yadav *et al.* 2013].

Dans 70 % des cas, le décès est lié à la dissémination métastatique principalement dans les poumons et le foie. Les 30 % de décès restants sont liés à une extension locale de la tumeur, touchant les tissus péri-pancréatiques, l'estomac, la rate, ou le colon [Vincent *et al.* 2011 ; Siegel *et al.* 2012 ; Yadav *et al.* 2013].

Le cancer du pancréas est actuellement perçu comme un problème majeur de santé publique, et cela de façon durable car les projections le placent en 2^{ème} position des cancers les plus mortels en 2030 [Rahib *et al.* 2014].

III) Types Histologiques :

En terme d'incidence, la composante exocrine du pancréas est la plus importante et 90% des tumeurs pancréatiques sont des tumeurs exocrines. Parmi ces tumeurs,

85% sont des adénocarcinomes canaux pancréatiques (ACP) qui se développent au niveau des cellules exocrines des canaux excréteurs du pancréas, les cellules acineuses. Les 15 % restants correspondent à plusieurs types histologiques de cancers comme les tumeurs neuroendocrines (2 à 3% des cas), les ampullomes (qui sont des tumeurs de l'ampoule de Vater, > 1% des cas) ou encore les cystadénomes (tumeurs kystique canalaire, 1 à 2% des cas) [Vincent *et al.* 2011 ; Siegel *et al.* 2012 ; Yadav *et al.* 2013].

La majeure partie des tumeurs d'ACP se développent au niveau de la tête du pancréas et sont ainsi en contact direct avec les grands vaisseaux abdominaux, rendant la chirurgie difficile [Yadav *et al.* 2013].

Il s'agit d'un cancer hautement métastatique, c'est pourquoi la totalité des patients souffrant d'ACP développent des tumeurs secondaires. Ce sont ces métastases qui se développent principalement sur des organes tels que le foie qui sont responsables du très faible taux de survie lié à l'ACP.

L'espérance de vie après diagnostic d'un cancer du pancréas se chiffre en mois, et ce à cause de la dissémination métastatique précoce, de la résistance de la tumeur aux traitements et de l'affaiblissement de l'organisme (cachexie, asthénie) généré par l'ACP [Yadav *et al.* 2013].

L'ACP compte parmi les cancers les plus mortels, puisqu'il n'existe aucun dépistage, ni traitement efficace pour cette pathologie en dehors de la chimiothérapie et de la chirurgie.

IV) Facteurs de risques de l'ACP :

Le développement du cancer pancréatique est facilité par un certain nombre de facteurs de risques d'ordre comportemental (modifiables) ou génétique (Tableau 1).

Parmi les facteurs impliqués dans la genèse de l'ACP on retrouve comme principales causes le tabac, mais aussi la consommation d'alcool, une alimentation trop riche en graisses saturées, ainsi que l'âge avancé. On considère que le tabac est responsable de 20 à 30% des cancers du pancréas [Becker *et al.* 2014].

L'alcool, quant à lui, augmente le risque de pancréatite chronique qui, constitue une lésion précancéreuse favorable au développement de l'ACP.

La forme héréditaire de pancréatite chronique constitue également un risque majeur puisque les patients en étant atteint ont entre 40 et 55% de risque de développer un cancer pancréatique au cours de leur vie [Yadav *et al.* 2013].

La composante génétique peut également participer à la genèse de l'ACP puisque l'on considère que 5 à 10 % des cas sont liés à un contexte familial (gène *BRCA1*, *BRCA2* ou encore *PRSS1* muté) (Tableau 1) [Vincent *et al.* 2011 ; Becker *et al.* 2014].

Tableau 1) Facteurs de risques de l'ACP :

Facteurs de risques	Risque (%)	Facteurs protecteurs
<i>Facteurs modifiables</i>		
Tabagisme	+ 70 – 120%	Arrêt des consommations nocives.
Consommation d'alcool excessive (< 3 verres / jour)	+ 20 – 40%	
Obésité	+ 50 – 180%	Régime ne dépassant pas 2000 kcal / j, pauvre en acides gras saturés, et riche en légumes et en magnésium.
Alimentation riche en graisses et viandes rouges	+ 20 %	
Diabète de type 2	+ 80 %	
<i>Facteurs non modifiables</i>		
Diabète de type 1	+ 100 %	
Gastrectomie	+ 50 %	
Pancréatite chronique	+ 1230 %	
Cholécystectomie	+ 20 %	

Infection par <i>Helicobacter pylori</i>	+ 40 %
Mutation <i>BRCA1</i>	+ 130 – 260%
Mutation <i>BRCA2</i>	+ 200 – 900%
Mutation <i>PRSS1</i> (pancréatite héréditaire)	40 %

V) Signes cliniques et traitements :

La mortalité élevée de l'ACP est à mettre en relation avec le développement silencieux de la pathologie et le fait qu'il n'existe aucun symptôme précoce perceptible par le patient, ni dépistage efficace. Malgré cela, il existe un certain nombre de signes cliniques tardifs attestant de la présence d'un ACP. Ainsi, le développement trop important d'une tumeur pancréatique peut générer des douleurs abdominales et dorsales liées à la constriction des nerfs et des gros vaisseaux. La présence d'un ACP avancé est également traduite par des atteintes du système digestif, avec perte de poids et d'appétit, accompagnées de troubles hépatiques (difficultés d'écoulement biliaire) **[Lowenfels et Maisonneuve 2006]**.

Le seul traitement efficace contre l'ACP reste la chirurgie précoce, qui n'est malheureusement pas toujours possible en raison de la détection tardive de l'ACP associée à des métastases chimiorésistantes. C'est pourquoi seul 1 patient sur 5 peut en bénéficier. Néanmoins, même après une opération combinée à une chimiothérapie, le taux de survie à 5 ans s'élève à seulement 20%. Concernant les autres cas, tumeurs non-opérables, métastatiques ou locale envahissante, il n'existe que des traitements palliatifs. Il est à noter que les tumeurs d'ACP sont très souvent jugées non « résécables » ou « résécables limite » en raison de la taille de leur stroma et de leur proximité directe avec les vaisseaux **[Lowenfels et Maisonneuve 2006]**. Il est également possible de prescrire un traitement chimiothérapeutique à large spectre ou encore une radiothérapie pour des ACP faiblement développés **[Pierantoni et al. 2008]**. Néanmoins, les traitements chimiothérapeutiques

approuvés pour les tumeurs d'ACP inopérables, principalement la gemcitabine, n'ont pas démontré d'effets thérapeutiques significatifs [Lohr *et al.* 2009]. A l'heure actuelle, les mécanismes de chimiorésistance de l'ACP demeurent mal connus et font l'objet de nombreuses études [Lee *et al.* 1995; Colby *et al.* 2008 ; Jung *et al.* 2011].

L'ACP est donc un problème de Santé publique majeur et il existe actuellement un besoin important d'identifier de nouveaux marqueurs ainsi que de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents au développement de cette maladie.

VI) Progression de l'ACP :

1) Lésions précancéreuses dans l'ACP :

Comme tout cancer, l'ACP est une pathologie évolutive qui se développe à partir de lésions précancéreuses non-invasives [Scarlett *et al.* 2011]. La pathologie se développe ensuite par l'acquisition de nombreuses altérations génétiques et par des mécanismes de sélection clonale.

Il existe 3 lésions précancéreuses principales concernant l'ACP. La néoplasie pancréatique intraépithéliale invasive (PanINs), la néoplasie intraductale papillaire mucineuse (IPMN) et le cystadénome mucineux (MCN) (Figure 3) [Yonezawa *et al.* 2008].

Dans 90% des cas, l'ACP se développe à partir de PanIN, il s'agit du type de lésion précurseur majoritaire [Koorstra *et al.* 2008]. Le développement des PanIN se fait à partir des cellules canalaire ou acineuses dans les ramifications terminales des canaux pancréatiques, et est très difficilement détectable par les méthodes d'imageries médicales [Lee *et al.* 2018]. La progression vers l'ACP s'effectue en plusieurs étapes caractérisées par une désorganisation de plus en plus importante de l'épithélium avec une accumulation progressive d'atypies cytologiques architecturales et de mutations génétiques. L'étape initiale, ou stade précancéreux est qualifiée de PanIN-1, elle est caractérisée par une hyperplasie tissulaire liée à la

prolifération cellulaire aberrante. Le volume cellulaire grandissant, induit par la prolifération des cellules du néoplasme, entraîne une dysplasie plus ou moins importante en fonction du type de lésion. Ainsi, les PanIN-2 sont caractérisées par une dysplasie intermédiaire, alors qu'une dysplasie sévère correspond au PanIN-3, ultime stade précancéreux (Figure 3)[Scarlett *et al.* 2011 ; Koorstra *et al.* 2008].

Contrairement au PanIN, les IPMN et MCN sont des lésions pouvant être facilement détectées en imagerie médicale. Une détection précoce de ces lésions macroscopiques permet d'ailleurs d'envisager une intervention chirurgicale et améliore le pronostic vital des patients [Yonezawa *et al.* 2008 ; Koorstra *et al.* 2008].

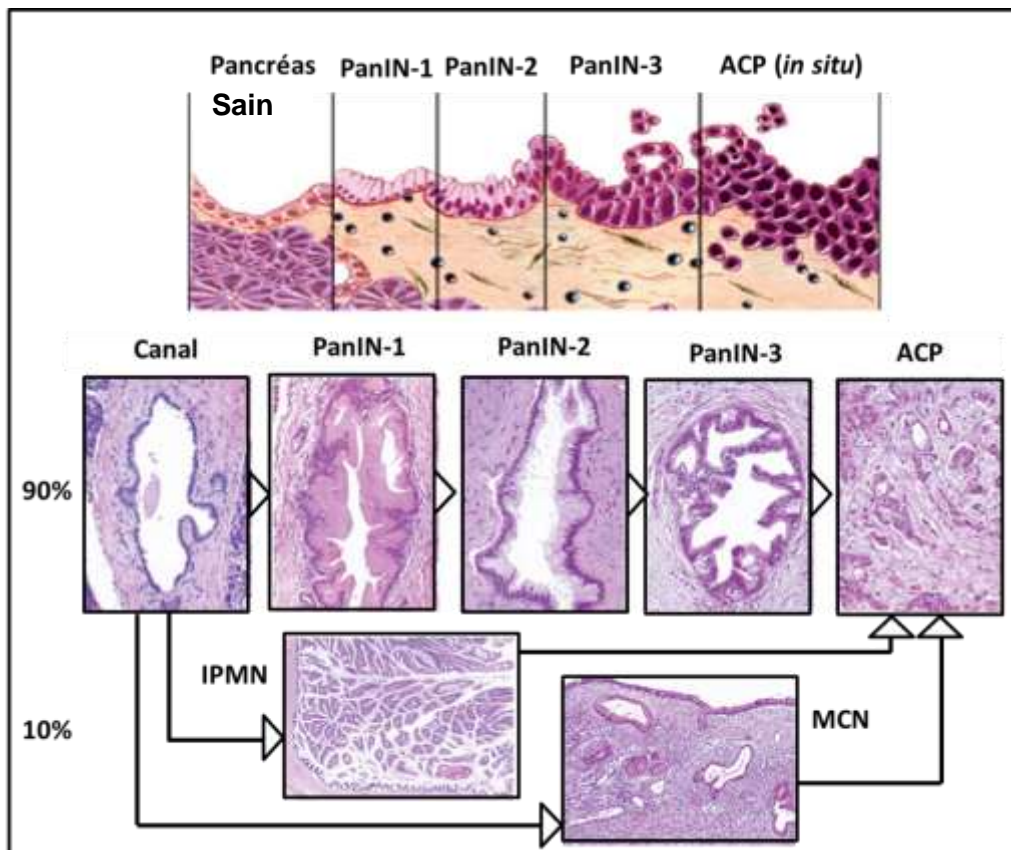


Figure 3) Lésions précancéreuses et progression de l'ACP :

Evolution de l'épithélium canalaire pancréatique à travers les différentes lésions précancéreuses. Les PanINs représentent les lésions majoritaires (90% des cas).

Modifié d'après [Hezel *et al.* 2006 ; Logsdon *et al.* 2010].

Avec l'accumulation de lésions précancéreuses, le tissu pancréatique fini par entrer dans le stade de cancer *in situ*. Il s'agit du premier stade de développement du cancer, correspondant uniquement à la tumeur primaire. Ce stade est caractérisé par la croissance tumorale dans les limites du tissu initial et précède le stade de dissémination métastatique. Enfin, le cancer atteint un statu invasif lorsqu'il dépasse les limites du tissu pancréatique et essaime de nombreuses cellules cancéreuses pouvant former des tumeurs secondaires ou métastases dans des tissus cibles (Figure 3).

2) Inflammation chronique et ACP :

Le développement de l'ACP et la genèse de lésions précancéreuses dépendent de phénomènes inflammatoires antérieurs. Des épisodes inflammatoires répétés finissent par générer des lésions propices à l'apparition du cancer (Figure 4). En effet, il a été démontré que des épisodes inflammatoires chroniques du tissu pancréatique augmentent grandement le risque de développer un ACP **[Kolodecik et al. 2014]**.

La pancréatite aiguë est une inflammation grave du tissu pancréatique, elle est principalement induite par une consommation excessive d'alcool, une hyperlipidémie, un choc traumatique, la présence d'agents toxiques, ou, plus rarement, liée à des facteurs génétiques (Figure 4) **[Kolodecik et al. 2013]**. L'apparition d'une pancréatite chronique est un processus évolutif divisé en plusieurs étapes et initié par le stade de pré-pancréatite associé aux facteurs de risques tels que l'alcool, l'obésité ou le tabagisme. Les symptômes sont multiples : activation pathologique des enzymes digestives au sein des cellules acineuses, diminution de la sécrétion des enzymes impliquées dans la digestion, réponse inflammatoire développée et mortalité cellulaire importante. **[Spanier et al. 2008 ; Peery et al. 2012]**. Cet épisode inflammatoire aigu disparaît suite au processus de réparation tissulaire sans engendrer de conséquence grave. Toutefois, dans le cas où la pancréatite aiguë devient un processus récurrent, cela peut aboutir à l'apparition de pancréatites chroniques. Le stade aiguë peut évoluer en pancréatite aiguë caractérisée par le relargage de cytokines inflammatoires par les cellules immunitaires, et l'activation des enzymes digestives (cathepsine-B, trypsinogène) au sein des cellules acinaires

qui amorcent leur autodigestion. Il a été démontré que l'inactivation de la cathepsine-B contribue à réduire l'inflammation pancréatique et la sévérité de la pancréatite [Halangk *et al.* 2000 ; VanAcker *et al.* 2002] De plus, l'autodigestion des cellules acinaires est associée à une élévation de la concentration calcique intracellulaire anormale, favorisant l'activation du trypsinogène [Petersen *et al.* 2011]. En cas de stimulation prolongé ou de lésion sévère il y a induction de l'activation des CSP, ce phénomène advient au cours du stade de pancréatite aiguë récurrente. L'occurrence de pancréatites aiguës récurrentes est facilitée par la mutation de gènes impliqués dans le contrôle des enzymes digestives (*SPINK1*, *CTRC*, *PRSS1*), mais également par un déficit d'autophagie des cellules acinaires induisant des lésions cellulaires graves et *in fine* l'inflammation. [Whitcomb *et al.* 1996 ; Fortunato *et al.* 2009]

La pancréatite chronique est caractérisée par une destruction et un remplacement du parenchyme pancréatique par un tissu fibreux (fibrose tissulaire), lié à l'activation des cellules stellaires pancréatiques (CSP) présentes en périphérie des acini exocrines et responsables de l'accumulation de tissu fibreux. La pathologie est également caractérisée par une infiltration importante des mononucléaires ainsi qu'une atteinte des cellules acineuses [Shrikhande *et al.* 2003]. L'activation des CSP conduit à la mise en place de la fibrose tissulaire caractéristique de la phase de pancréatite chronique [Whitcomb *et al.* 2011 ; Whitcomb *et al.* 2012]. La pancréatite chronique est également facilitée par des mutations génétiques (notamment du gène *PRSS*) et par l'inflammation tissulaire prolongée. Enfin, la formation du cancer *in situ* de même que l'acquisition d'un phénotype invasif sont influencés par la mutation activatrice de l'oncogène Kras et par la perte des anti-oncogènes p53 et p16 (Figure 4) [Whitcomb *et al.* 1996 ; Fortunato *et al.* 2009].

La présence d'une pancréatite chronique multiplie le risque de développer un cancer pancréatique par 13,3 et constitue le facteur de risque de l'ACP le plus important (Tableau 1) [Raimondi *et al.* 2010].

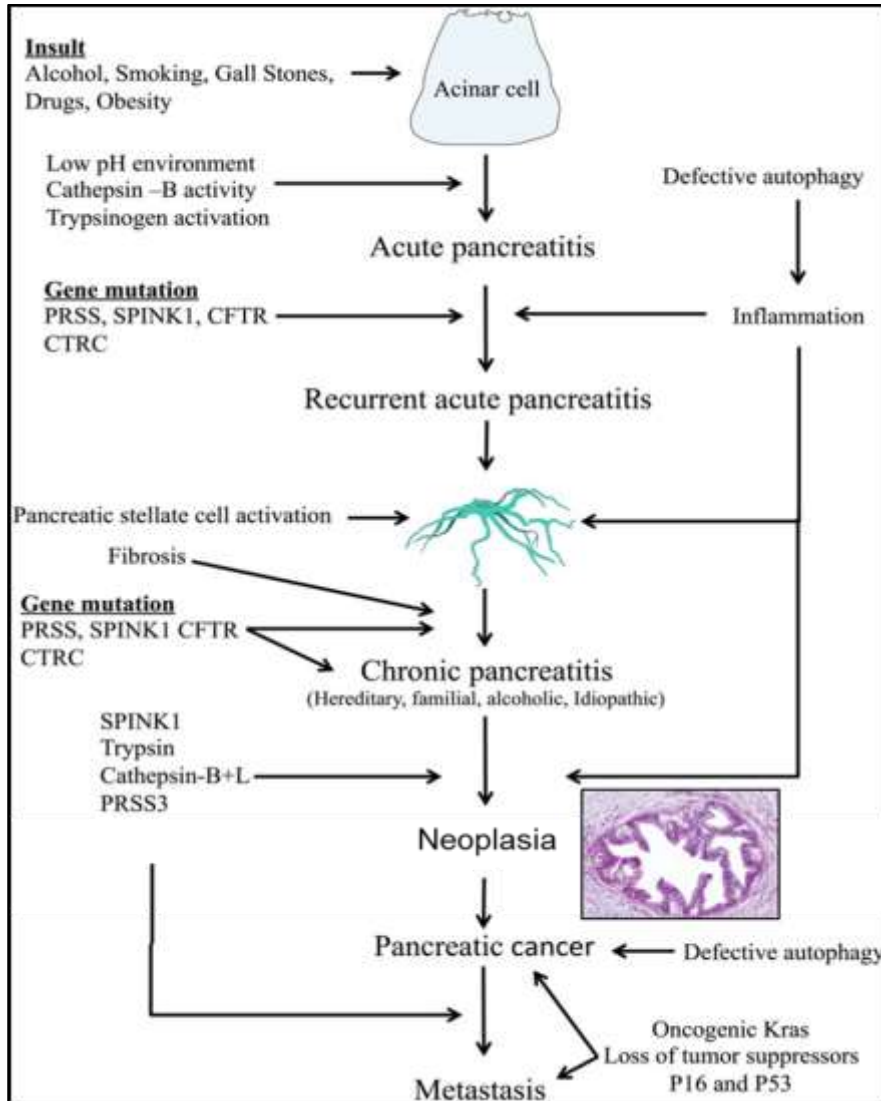


Figure 4) inflammation chronique et développement de l'ACP :

Schéma présentant l'amplification du processus inflammatoire de la cellule saine à l'ACP. Les facteurs traumatiques initient le processus poursuivi par l'activation des enzymes digestives. L'activation des CSP permet l'apparition de pancréatite chronique amenant aux lésions précancéreuses et à l'ACP.

Modifié d'après [Kolodecik *et al.* 2013].

CHAPITRE 2) LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL :

I) Généralité sur le microenvironnement tumoral :

1) Le microenvironnement, une caractéristique de la cellule cancéreuse :

Bien qu'étant une pathologie très hétérogène, le cancer possède 6 caractéristiques communes à tous les types histologiques. En effet, indépendamment de critères de localisation ou du type de mutation impliqué, les cellules cancéreuses sont toutes caractérisées par : 1) une insensibilité aux suppresseurs de la croissance cellulaire, 2) une immortalité répliquative, 3) des propriétés invasives conduisant à la formation de métastases, 4) une autonomie proliférative, 5) une résistance à la mortalité cellulaire et, 6) favorise la néoangiogenèse tumorale (Figure 5) [Hanahan et Weinberg 2000].

Le modèle de caractérisation du cancer développé par Hanahan et Weinberg en 2000, et comptant initialement 6 caractéristiques, a été remis à jour en 2011. Quatre nouvelles caractéristiques ont été ajoutées en tenant compte des avancées récentes de la recherche en cancérologie. Parmi ces caractéristiques émergentes, on compte, entre autres, la capacité de la tumeur à façonner un environnement inflammatoire pro-tumoral [Hanahan et Weinberg 2011]. Cet environnement inflammatoire mis en place par la tumeur a également des conséquences sur les cellules avoisinantes. Les répercussions du développement de la tumeur sur les tissus voisins permettent

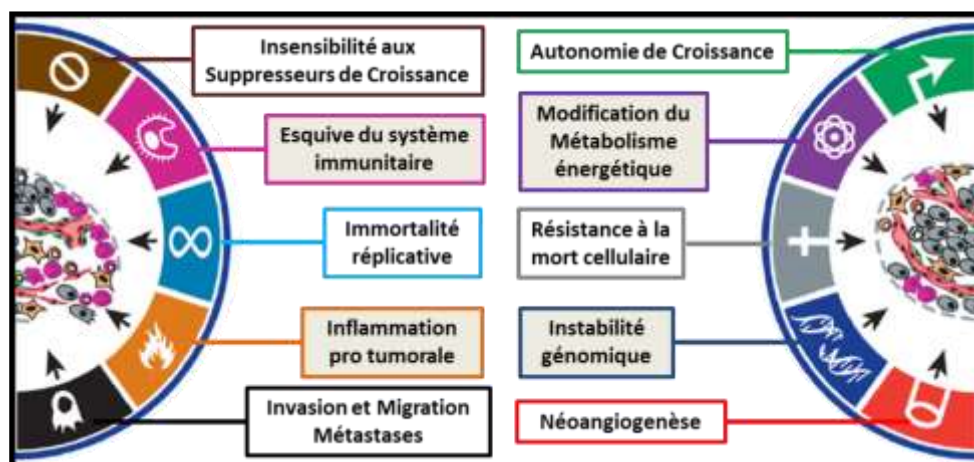


Figure 5) Les caractéristiques de la cellule cancéreuse :

Les 6 caractéristiques initiales (2000) sont représentées sur fond blanc, les caractéristiques émergentes (2011) sont représentées sur fond gris.

Modifié d'après [Hanahan et Weinberg 2011].

d'intégrer la notion de microenvironnement tumoral (MET) dans le développement de la pathologie cancéreuse [Hanahan et Coussens 2012].

2) La tumeur et son microenvironnement :

Le cancer est un processus complexe impliquant également de nombreux acteurs « extra-tumoraux » présents dans l'environnement proche de la cellule épithéliale cancéreuse. Ces acteurs non-tumoraux agissent de concert afin de favoriser le développement cancéreux et sont regroupés au sein d'un compartiment jouxtant la tumeur, qualifié de stroma tumoral ou encore de microenvironnement tumoral (MET) [Quail *et al.* 2013].

La tumeur est actuellement reconnue comme un organe à part entière, animé par une dynamique d'évolution permanente et continuellement soumise à des modifications d'ordre génétiques, et morphologiques. Le MET, étroitement lié à la tumeur, est soumis aux mêmes types de modifications, la principale étant son activation lors des premières phases de contact avec la tumeur. [Gatenby *et al.* 2008].

Suite à l'activation du stroma tumoral la communication avec les cellules cancéreuses se poursuit et les deux compartiments subissent des changements et une évolution analogue. L'échange entre la tumeur et son stroma conduit notamment à un important remodelage de la MEC. Or, la modification de la composition matricielle ainsi que l'augmentation de la disponibilité en matrikines favorisent le développement tumoral [Li *et al.* 2007b ; Shimoda *et al.* 2010].

L'importance du MET dans la progression cancéreuse et la genèse des métastases a été mise en évidence dans de nombreux cancers solides, parmi lesquels, les cancers mammaires, pulmonaires, rénaux, prostatiques, hépatiques (Carcinome Hépatocellulaire : CHC), ou encore pancréatiques (Adénocarcinome Canalaire Pancréatique : ACP) [Quail *et al.* 2013].

Ce compartiment extra-tumoral est également présent sous forme de stroma sain dans l'organe en condition physiologique et peut concourir à l'initiation tumorale *via*

son inflammation chronique, ce qui conditionne et accélère le processus de tumorigénèse. Lors de l'initiation du cancer, les régions proches vont alors rentrer en contact avec la tumeur, devenant ainsi le MET, et la progression du cancer va ensuite dépendre de l'échange prolongé entre la tumeur et son stroma.

II) La réaction desmoplastique :

Le processus de fibrose tissulaire est initié lors de l'invasion du stroma par les cellules cancéreuses et l'activation des composantes cellulaires stromales. La caractéristique fondamentale de l'activation du MET est la présence d'un abondant dépôt de tissu connectif fibreux enchâssant la tumeur. **[Vonlaufen et al. 2008a et b]**. Ce phénomène, appelé réaction desmoplastique (RD), peut atteindre jusqu'à 90% de la masse totale de la tumeur et est directement corrélé avec l'agressivité, le développement rapide et la chimiorésistance de l'ACP **[Erkan et al. 2012 ; Mahadevan et al. 2007 ; Schober et al. 2014]**. Il est à noter qu'un important volume de stroma pathologique est également mis en place dans certains carcinomes mammaires, cancer de l'estomac, et d'autres types histologiques de cancer pancréatique **[Benard et al. 2004]**.

Ce stroma est dit « pathologique » car sa composition diffère d'un stroma sain. Il est composé en majorité de tissus connectifs fibreux appartenant à la Matrice Extra-Cellulaire (MEC). Lors de la RD, il y a augmentation de la synthèse de collagène de type I, et III, cette synthèse étant multipliée par 3 dans l'ACP par rapport au pancréas sain, le tout accompagné d'une perte de la membrane basale ce qui diminue l'interaction entre les cellules et la MEC et facilite la génération de métastases **[Rønnov-Jessen et al. 1996]**.

Par sa position anatomique, le MET est en communication permanente avec la tumeur. Cette communication se fait par le biais de facteurs solubles issus de cellules stromales (facteurs de croissances, cytokines, enzymes sécrétées) mais également *via* des facteurs issus de la dégradation de la MEC (peptides matrikines, facteurs de croissances séquestrés dans les fibres matricielles) ou par le biais de fibres matricielles intègres (liaison matrice/intégrines). La communication MET-

tumeur est bi-directionnelle, et aboutit aussi bien à des modifications des cellules cancéreuses qu'au renforcement de l'activation du stroma [Rønnov-Jessen *et al.* 1996].

III) Composition du microenvironnement tumoral :

Le qualificatif de « MET » regroupe en réalité de nombreuses composantes à la fois moléculaires et cellulaires. Il s'agit de l'association en structure complexe et organisée de tous les éléments acellulaires composant la MEC ainsi que de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes (Cancer Associated Fibroblasts : CAF), cellules immunitaire (Lymphocytes, Cancer Associated Macrophages : CAM), cellules endothéliales (mais également des cellules musculaires lisses vasculaires ou encore péricytes) et cellules nerveuses (Figures 6, 7 et 8) [Gupta *et al.* 2006 ; Joyce *et al.* 2009 ; Brabek *et al.* 2010 ; Moir *et al.* 2015 ; Gasparini *et al.* 2019].

1) La composante matricielle acellulaire :

La MEC est un maillage complexe de macromolécules associées, formant un réseau tridimensionnel enchâssant les cellules (Figure 6). Elle est omniprésente dans l'organisme et constitue le support physique des cellules dans l'ensemble des tissus et organes.

Loin de n'assumer qu'une fonction de soutien, elle est également impliquée dans une multitude de processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, l'adhésion, la migration, la différenciation, ou encore le maintien de la morphologie cellulaire et de l'homéostasie hydrique [Frantz *et al.* 2010 ; Theocharis *et al.* 2012 ; Clause *et al.* 2013]. Les effets de la MEC sont assurés par l'interaction entre les diverses macromolécules la composant et les récepteurs membranaires des cellules tels que les intégrines (Figure 6). [Theocharis *et al.* 2012 et 2016]

Les macromolécules composant la MEC sont sécrétées par les fibroblastes de même que les MMP (Matrix MetalloProteinase) et TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase) impliqués dans la dégradation des fibres et permettant le remodelage matriciel **[Moir et al. 2015]**.

La composition de la MEC varie beaucoup d'un tissu à l'autre, elle est cependant constituée de protéines fibreuses comme le collagène, l'élastine, les fibronectines (FN), les laminines, les glycoprotéines, et protéoglycanes (PG) ainsi que les glycosaminoglycanes (GAGs) hautement hydratés. La matrice des tissus est majoritairement composée de collagène fibrillaire de type I, associé aux autres protéines matricielles et au PG afin de former des macrostructures fibrillaires. Ces structures sont interconnectées et forment un réseau matricielle tridimensionnel complexe (Figure 6) **[Frantz et al. 2010 ; Theocharis et al. 2012 ; Clause et al. 2013]**. La MEC est un réseau extrêmement dynamique remodelé en permanence sous l'effet de nombreuses enzymes de dégradation (MMP), de régulation (TIMP) et de polypeptides matriciels néosynthétisés. Des dérégulations du remodelage et/ou de la composition moléculaire de la MEC favorisent le développement de nombreuses pathologies, et notamment du cancer **[Frantz et al. 2010]**.

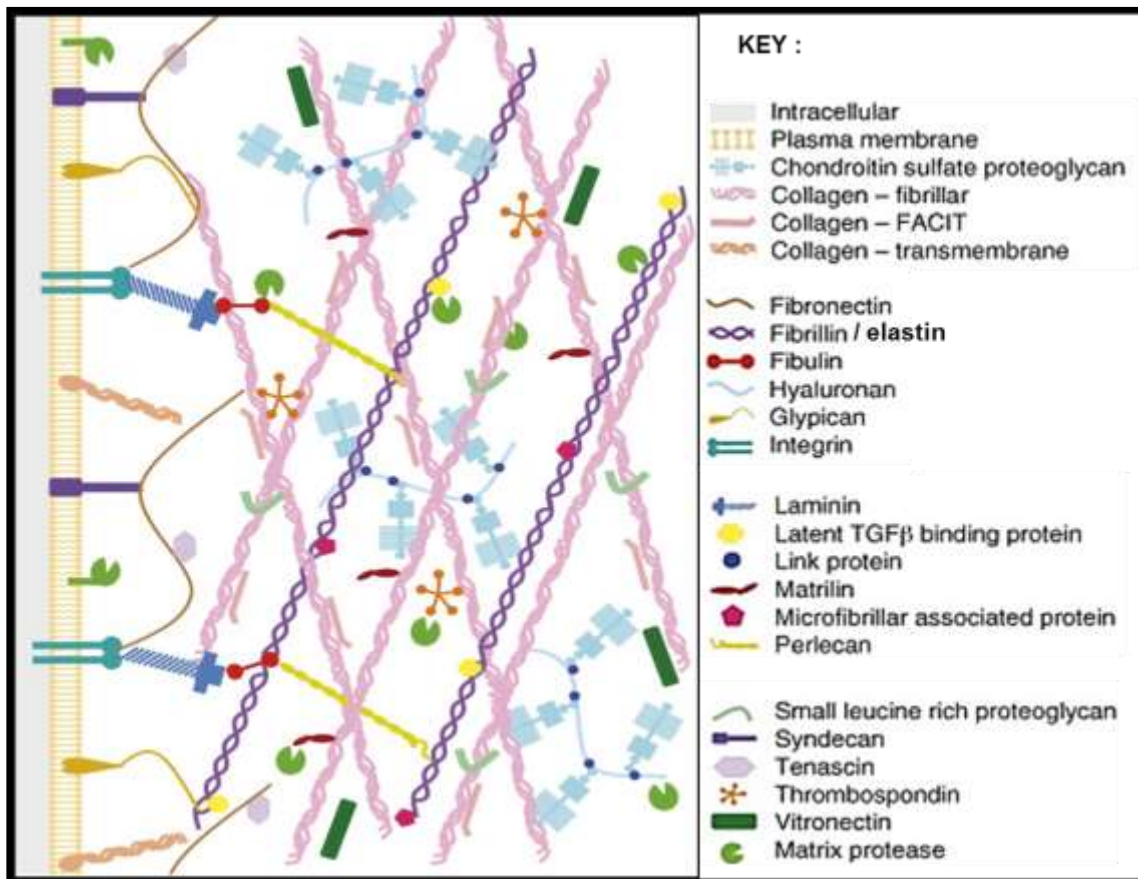


Figure 6) Composition de la matrice extracellulaire :

Schéma représentant l'organisation générale de la MEC avec : les fibres de soutien (collagènes), les fibres élastiques (fibrilline, élastine), les protéoglycanes, les petites protéines matricielles (protéines de liaisons), les MMP ainsi que certains éléments impliqués dans l'interaction cellule / MEC tels que les intégrines et le Collagène FACIT : Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices.

Modifié d'après [Huxley-Jones *et al.* 2008].

2) Matrice extracellulaire et cancer :

La composition de la MEC est relativement stable au sein d'un tissu, néanmoins, elle est amenée à subir un remodelage important sous l'effet de stimuli particuliers (Figure 7). En cas de lésion tissulaire ou d'inflammation chronique la composition de la MEC varie suite à l'activation des fibroblastes. Le processus de fibrose tissulaire s'accompagne d'une augmentation de la synthèse de collagène, de fibronectine et

d'acide hyaluronique permettant la mise en place d'un cal fibreux et la cicatrisation tissulaire. Le processus est réversible et la MEC retrouve une composition physiologique en cas de régénération tissulaire. Dans le contexte du cancer la MEC devient riche en collagène, fibronectine, PG et en élastine. La variation de composition matricielle induite par le cancer est une condition favorable à la progression tumorale (Figure 7) [Hynes, 2009 ; Frantz *et al.* 2010].

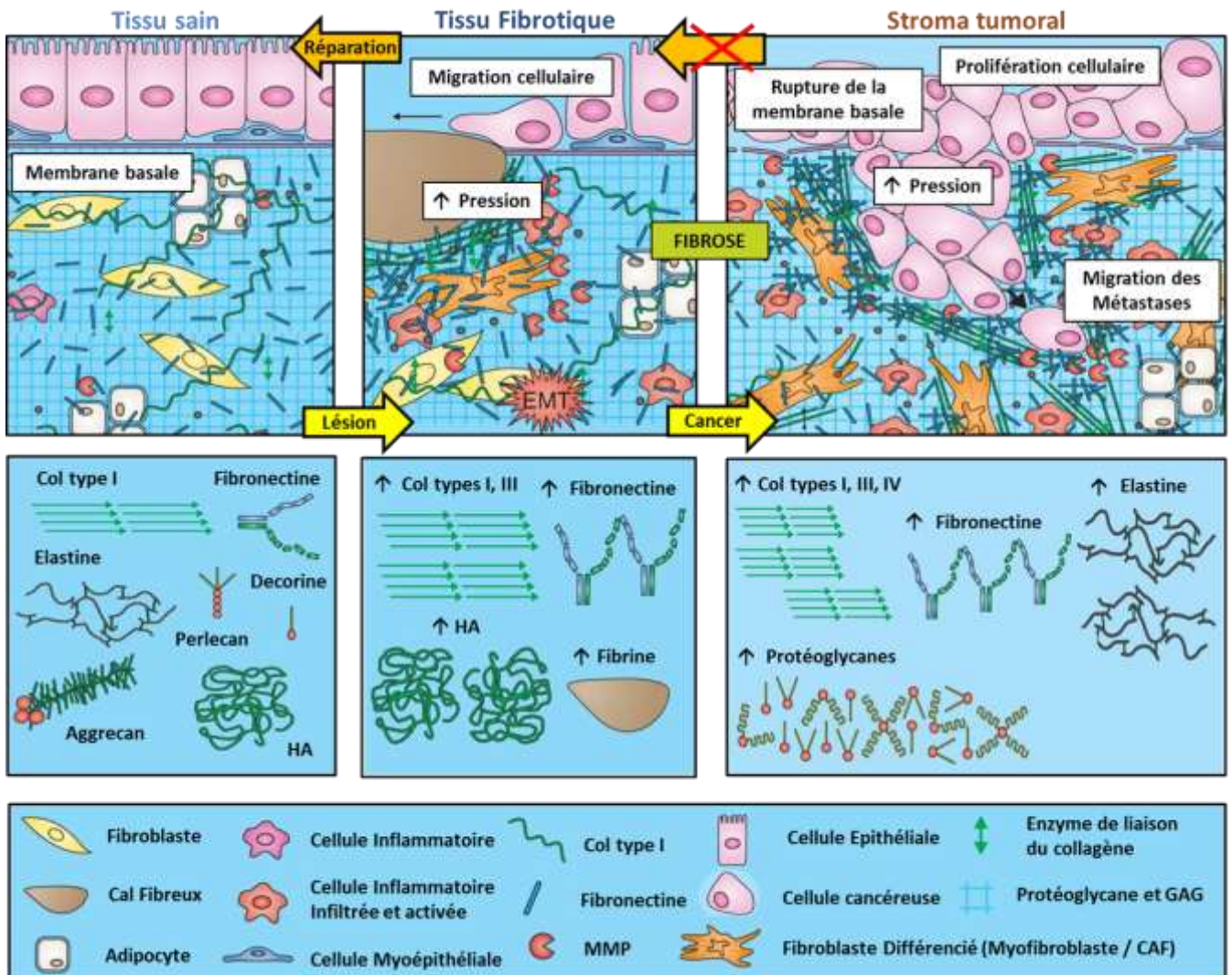


Figure 7) Le microenvironnement et la MEC : évolution du physiologique au pathologique :

La composition de la MEC varie en fonction du contexte. Dans le cadre de la fibrose il y a augmentation de la synthèse de collagène, HA et fibronectine. La MEC du stroma tumoral exprime d'avantage de collagène et de fibronectine, de plus, la synthèse d'élastine, inexistante à l'âge adulte, est réamorcée et la sécrétion de MMP est importante. Avec : « HA » : Acide hyaluronique ; « GAG » : glycosaminoglycane ; « CAF » : Fibroblaste associé au cancer ; « MMP » : métalloprotéase matricielle.

Modifié d'après [Frantz *et al.* 2010].

La MEC joue un rôle de premier plan dans la progression tumorale, la génération de métastases et facilite la chimiorésistance **[Seo et al. 2014 ; Skandalis et al. 2012]**

En effet, le processus de remodelage matriciel varie durant le cancer et impacte directement la composition de la MEC. De nombreuses protéines matricielles jouent alors un rôle important dans la signalisation cancéreuse au sein du MET et sont considérées comme d'éventuelles cibles thérapeutiques de même que leurs récepteurs membranaires sur les cellules cancéreuses. La MEC est notamment impliquée dans la chimiorésistance en tamponnant les agents chimiothérapeutiques et en facilitant la récurrence du cancer **[Khawar et al. 2015]**. La MEC représente un volume important de matière qui exerce une pression sur la circulation tumorale et engendre des conditions hypoxiques et un stress mécanique favorable à la tumeur **[Jain et al. 2013]**. Le stress mécanique exercé par la tumeur induit un blocage partiel sur la circulation sanguine augmente la perméabilité et défavorise la circulation de molécules chimiothérapeutiques **[Seo et al. 2014 ; Khawar et al. 2015]**. De nombreux peptides matriciels tels que le collagène de type IV, XVIII, et les laminines sont directement impliqués dans ce processus et les cibler permettrait de faciliter l'accès des agents thérapeutiques à la tumeur **[Rosca et al. 2011]**. Ainsi l'utilisation d'un inhibiteur des Héparane Sulfates combiné aux agents thérapeutiques classique aboutit à une meilleur délivrance du traitement, réduit la croissance tumorale et la néoangiogenèse **[Ritchie et al. 2011]**.

La MEC « pathologique » contient également d'avantage de collagène fibrillaire, et le volume de matrice est très important, désorganisé, rigide et particulièrement dense ce qui ralenti la diffusion du traitement (Figure 7) **[Seo et al. 2014]**. L'accumulation de PG et d'acide hyaluronique augmente également la viscosité matricielle et crée de nombreuses poches de rétention du traitement par interactions électrostatiques **[Seo et al. 2014]**. Dans les tumeurs hautement desmoplastiques l'utilisation de collagénase et de MMP permet d'augmenter l'efficacité des traitements **[Jain et al. 2013]** Il a notamment été démontré que l'inhibition de la LOX (lysyl oxydase) impliquée dans les modifications post-traductionnelles des protéines matricielles réduit l'activation de la voie du TGF- β sur les cellules cancéreuses et le nombre de CAF **[Barry-Hamilton et al. 2010]**. Le blocage de la voie du TGF- β permet de modifier la conformation matricielle du MET et augmente l'efficacité de la doxorubicine **[Liao et al. 2011 ; Liu et al. 2012]**. De la même façon il a été démontré

que l'utilisation d'agents antifibrotiques en association avec des drogues chimiothérapeutiques induit une réorganisation de la matrice collagénique et diminue la production de collagène dans le stroma. Ces effets augmentent la pénétration et l'efficacité des drogues chimiothérapeutiques **[Jain et al. 2013]**.

3) Les matrikines dans le cancer :

La dégradation active de la MEC par les cellules tumorales et stromales dans le cancer provoque le relargage de nombreux fragments protéiques. Il a été démontré que ces peptides d'origine matriciels exercent une influence sur la signalisation cellulaire à l'instar des cytokines. Ces peptides matriciels qualifiés de matrikines (cytokine matricielle) sont impliqués dans le développement du cancer et la formation de métastases (Tableau 2) **[Maquart et al. 1999 ; Pupa et al. 2002 ; Maquart et al. 2004]**.

Du point de vue de la composition de la MEC, le cancer est caractérisé par l'abondance de fibres d'élastine dans le MET (Figure 7) **[Frantz et al. 2010]**.

La synthèse d'élastine est majoritairement effectuée dans les stades embryonnaires avec un pic avant la naissance et décroît progressivement pour s'arrêter à la puberté **[Uitto et al. 1991 ; Swee et al. 1995]**. La demi-vie de l'élastine est de 70 ans et la néosynthèse des fibres d'élastine est inexistante en condition physiologique **[Petersen et al. 2002]**. Les fibres élastiques sont constituées d'une charpente de fibres d'élastine sur laquelle repose un manteau de fibrilline **[Kielty et al. 2002]** et sont responsable des propriétés élastiques des tissus.

Les fibres d'élastine sont riches en résidus proline, valine et glycine et leur dégradation génère des peptides aux séquences proches. Parmi les peptides les plus étudiés en dehors de la kappa-élastine correspondant au produit total de la dégradation des macromolécules d'élastine, on compte les peptides AG-9 (AGVPGLGVG) et VG-6 (GVVAPG) **[Scandolera et al. 2016]**.

Il a été démontré que les fragments issus de la protéolyse de l'élastine sont hautement chimiotactiques et favorisent l'inflammation, la prolifération et

l'angiogenèse [Antonicelli *et al.* 2007] Les peptides d'élastine sont impliqués dans la migration, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse, la survie cellulaire ou encore l'adhésion dans de nombreux modèles cellulaires tels que les fibroblastes, les CMLV, les cellules endothéliales ou encore les cellules cancéreuses (Tableau 2) [Duca *et al.* 2004 ; Scandolera *et al.* 2016].

Tableau 2) Effets des peptides d'élastines sur les mécanismes cellulaires dans les cellules saines et cancéreuses :

Effets biologiques	Types cellulaires/ cancer	Références
Angiogenèse	Cellules endothéliales	Nackman <i>et al.</i> , 1997; Robinet <i>et al.</i> , 2005; Daamen <i>et al.</i> , 2008; Fahem <i>et al.</i> , 2008; Gunda <i>et al.</i> , 2013
Apoptose et survie cellulaire	Fibroblastes	Cantarelli <i>et al.</i> , 2009
	Lymphocytes	Péterszegi and Robert, 1998; Péterszegi <i>et al.</i> , 1999
Adhésion	Fibroblastes	Hornebeck <i>et al.</i> , 1986; Groult <i>et al.</i> , 1991; Yamamoto <i>et al.</i> , 2002; Rodgers and Weiss, 2004; Bax <i>et al.</i> , 2009; Akhtar <i>et al.</i> , 2011
	Astrocytome	Jung <i>et al.</i> , 1999
	Carcinome	Timar <i>et al.</i> , 1991; Svitkina and Parsons, 1993
	Mélanome	Timar <i>et al.</i> , 1991; Svitkina and Parsons, 1993
Prolifération	Fibroblastes	Ghuysen-Itard <i>et al.</i> , 1992; Kamoun <i>et al.</i> , 1995; Tyagi <i>et al.</i> , 1996; Tajima <i>et al.</i> , 1997; Duca <i>et al.</i> , 2005; Shiratsuchi <i>et al.</i> , 2010
	Lymphocytes	Poggi and Mingari, 1995; Péterszegi <i>et al.</i> , 1996
	Mélanome	Devy <i>et al.</i> , 2010
	Astrocytome	Jung <i>et al.</i> , 1998
	Gliome	Hinek <i>et al.</i> , 1999
	Cellules endothéliales	Ito <i>et al.</i> , 1998; Dutoya <i>et al.</i> , 2000
Invasion tumorale et sécrétion de protéases	Fibroblastes	Gminski <i>et al.</i> , 1991a,b; Archilla-Marcos and Robert, 1993; Landeau <i>et al.</i> , 1994; Brassart <i>et al.</i> , 2001; Huet <i>et al.</i> , 2001
	Cellules endothéliales	Robinet <i>et al.</i> , 2005; Fahem <i>et al.</i> , 2008; Siemianowicz <i>et al.</i> , 2010, 2015
	Monocytes	Fülöp <i>et al.</i> , 1986; Varga <i>et al.</i> , 1997
	Lymphocytes	Péterszegi <i>et al.</i> , 1996, 1999
	Mélanome	Ntayi <i>et al.</i> , 2004; Pocza <i>et al.</i> , 2008; Devy <i>et al.</i> , 2010
	Gliome	Coquerel <i>et al.</i> , 2009

	3LL-HM carcinome	Timar et al., 1991
	Cancer des poumons	Toupance et al., 2012
	HT1080 fibrosarcome	Brassart et al., 1998; Huet et al., 2002; Donet et al., 2014
Chimiotaxie et migration cellulaire	Kératinocytes	Fujimoto et al., 2000
	Fibroblastes	Senior et al., 1982, 1984; Mecham et al., 1989; Grosso and Scott, 1993b; Duca et al., 2005; Shiratsuchi et al., 2010
	Cellules endothéliales	Long et al., 1989; Skeie and Mullins, 2008; Skeie et al., 2012
	Monocytes	Senior et al., 1980, 1984; Bisaccia et al., 1994; Castiglione Morelli et al., 1997; Uemura and Okamoto, 1997; Hance et al., 2002; Houghton et al., 2006
	Macrophages	Kamisato et al., 1997; Guo et al., 2006, 2011
	3LL-HM carcinome	Timar et al., 1991
	M27 cancer des poumons	Blood et al., 1988; Blood and Zetter, 1989, 1993; Yusa et al., 1989; Grosso and Scott, 1993a
	Mélanome	Mecham et al., 1989; Poczka et al., 2008
	HT1080 fibrosarcome	Donet et al., 2014

La MEC pathologique mise en place dans le cadre de la réaction desmoplastique favorise le développement tumoral *via* de multiples mécanismes. En effet, les fibres matricielles comme les peptides issus de leurs dégradations favorisent les processus de cancérogenèse, de dispersion métastatique et de chimiorésistance.

4) La composante cellulaire stromale :

A) Les cellules endothéliales :

Le microenvironnement tumoral est riche en cellules endothéliales vasculaires initialement présentes dans le tissu sain et permettant son irrigation.

Durant la progression tumorale, sous l'influence de facteurs sécrétés par la tumeur tels que le TGF- β elles peuvent subir une transition phénotypique et devenir des cellules fibroblastiques [Nieman *et al.* 2011].

Il a été démontré que les traitements chimiothérapeutiques favorisent la sécrétion de TNF- α par les cellules endothéliales transformées ce qui induit la sécrétion de CXCL1 (chemokine C-X-C motif ligand 1) par les cellules cancéreuses et augmente leur survie et la chimiorésistance de la tumeur [**Acharyya et al. 2011**].

Les cellules endothéliales permettent également de favoriser la survie des cellules cancéreuses dans la circulation par interaction cellule/cellule, ainsi que le développement de métastases sur des sites distants [**Yadav et al. 2015**].

B) Les cellules immunitaires :

L'inflammation et la réaction immunitaire qui en dépend sont des facteurs de risque pour l'ACP. De nombreux acteurs et régulateurs de l'immunité sont présents dans le stroma et prennent part au développement de l'ACP. Parmi ces acteurs les cellules immunitaires contribuent également à la mise en place du MET. Contrairement aux autres types de cancer, l'ACP présente une certaine résistance aux traitements par immunothérapie en raison de son dense stroma immunosuppresseur [**Whitcomb et al. 2004a ; Whitcomb et al. 2009**].

Les cellules immunitaires constituent un vaste groupe composé de macrophages, cellules dendritiques, cellules NK (« Natural Killer »), cellules myéloïdes, ou encore de lymphocytes Treg (T régulateurs), toutes impliquées dans la mise en place d'un microenvironnement pro tumoral. Dans le cancer du sein les macrophages associés à la tumeur (cancer associated macrophage : CAM) appartenant à la famille des macrophages M2, favorisent l'immunosuppression, l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaire dans le MET [**Medrek et al. 2012**]. Il a été démontré que cibler les CAM aboutit à une diminution de l'invasion des clones tumoraux, de la formation de métastases, et de l'angiogenèse et favorise l'activité antitumorale des traitements chimiothérapeutiques [**DeNardo et al. 2011**].

Les cellules myéloïdes, quant à elles, favorisent le développement tumoral en régulant l'évasion des cellules de l'immunité anti-tumorale, le remodelage de la MEC ainsi que la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) des cellules cancéreuses mammaires [**Yu et al. 2013**]. L'activité des cellules dendritiques est également

dérégulée dans le cancer ce qui aboutit à une réduction de leur maturation et de leur différenciation [**Steinman et al. 2003**] Il a également été démontré que les cellules NK présentent une altération de la sécrétion de cytokines avec augmentation de synthèse du VEGF et du SDF-1 (Stromal-cell Derived Factor 1 ou CXCL12) favorisant l'angiogenèse et la progression tumorale du cancer pulmonaire [**Bruno et al. 2013**] Les T-reg favorisent également l'angiogenèse dans le cancer ovarien, en complément de leur activité inhibitrice sur l'infiltration des acteurs de l'immunité anti-tumorale [**Curiel et al. 2004 ; Facciabene et al. 2011**].

C) Les cellules nerveuses et adipocytes :

D'autres types cellulaires présents dans le MET jouent un rôle mineur dans l'activation du stroma et la progression tumorale. C'est le cas des cellules nerveuses qui participent principalement à l'inflammation du stroma et subissent des mécanismes de croissance aberrante et de remodelage induits par la tumeur [**Jurcak et al. 2019 ; Gasparini et al. 2019**] mais également des adipocytes, qui favorisent la formation de métastases et la TEM des cellules cancéreuses [**Dirat et al. 2011 ; Xiong et al. 2015**]. Il a également été démontré que les adipocytes favorisent la TME et l'agressivité des cellules pré-néoplasique pancréatique via la stimulation paracrine de la voie WNT (Wingless iNT-1) non-canonique [**Carbone et al. 2018**].

D) Les fibroblastes :

En condition physiologique, les fibroblastes régulent la structure et la fonction des tissus sains en permettant le remodelage matriciel et la régénération tissulaire [**Ohlund et al. 2014**]. Les fibroblastes représentent le type cellulaire majoritaire du microenvironnement tumoral et participent au développement de nombreux cancers tels que le cancer du sein, du colon, de la prostate ou encore l'ACP [**Ohlund et al. 2014**].

Initialement, les fibroblastes ont été définis comme des cellules du tissu connectif synthétisant le collagène [Virchow *et al.* 1858]. Ils sont caractérisés physiquement par leur forme « en broche », et sont ensevelis dans les fibres matricielles des tissus connectifs. De plus, ils possèdent un métabolisme lent et une faible activité transcriptionnelle qui a conduit à les considérer comme étant dans un état « d'hibernation », de repos ou encore à l'état quiescent [Sappino *et al.* 1990]

La principale fonction des fibroblastes est la réparation tissulaire (ou cicatrisation) par synthèse de composés appartenant à la MEC. En effet, les fibroblastes sont en mesure de sécréter la *quasi*-totalité des composants de la MEC, principalement le collagène de type I, III et V, les fibres élastiques (élastine), les fibronectines, mais également les composants de la lame basale comme le collagène de type IV et les

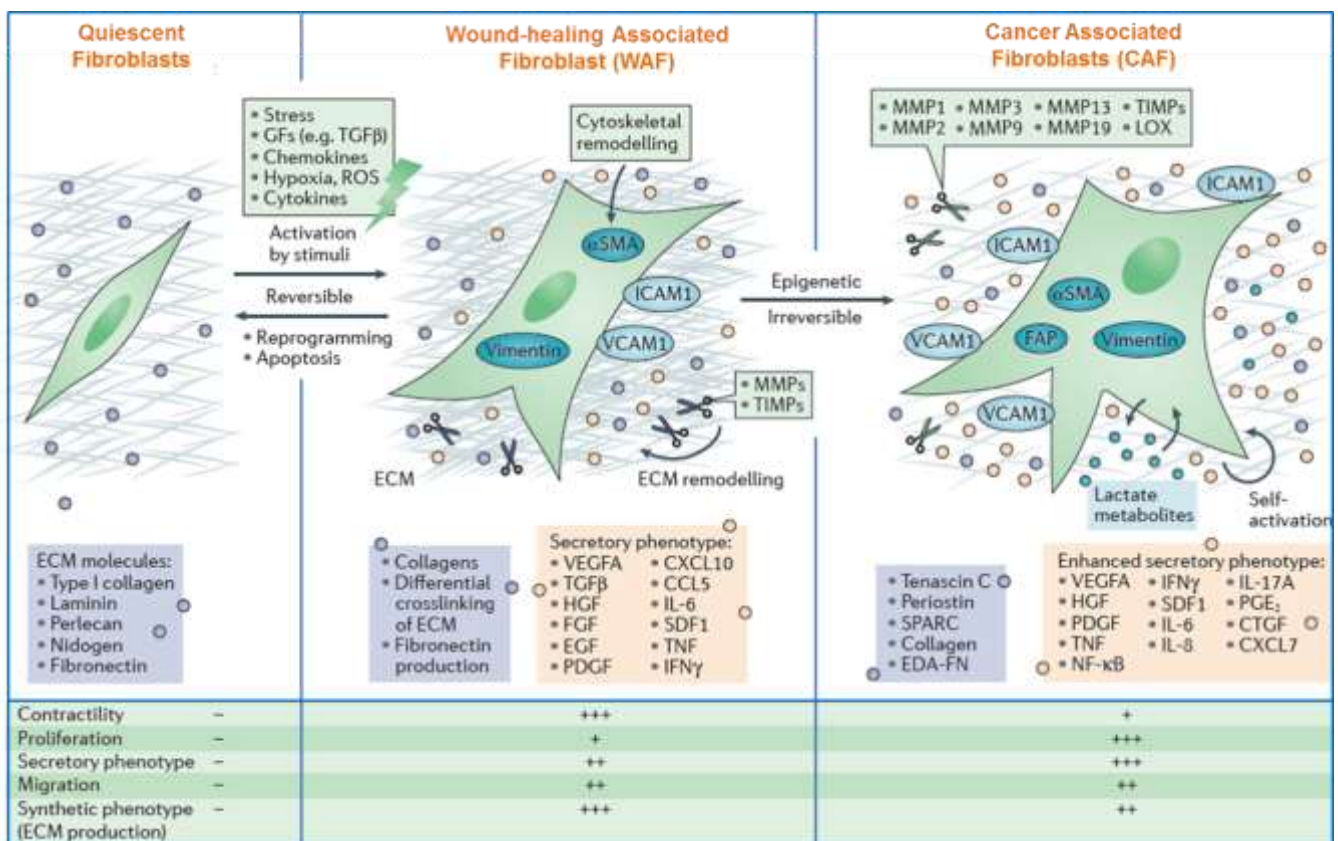


Figure 8) Activation des fibroblastes, fibrose et cancer :

Cinétique d'activation des fibroblastes depuis le tissu sain jusqu'au stroma tumoral : Les fibroblastes initialement quiescents sont activés par divers stimuli d'ordre traumatiques et participent à la régénération tissulaire. Les fibroblastes activés expriment les protéines contractiles α-SMA et vimentine ainsi que des composants matriciels. Les fibroblastes activés par la régénération tissulaire sont qualifiés de WAF, ils sont hautement contractiles et prolifèrent lentement. Sous l'influence tumorale, les fibroblastes amorcent une transition phénotypique supplémentaire et deviennent des CAF. Ils acquièrent un phénotype sécrétoire et prolifératif au détriment de leurs capacités contractiles.

Modifié d'après [Kalluri *et al.* 2016].

laminines [**Sappino et al. 1990 ; VonAhrens et al. 2017**]

Les fibroblastes sont également en mesure de remodeler la MEC en sécrétant des MétalloProtéases Matricielles (MMP) impliquées, entre autres, dans les processus d'invasion et de migration des cellules cancéreuses. Enfin, les fibroblastes jouent un rôle de « cellules nourricières » puisqu'ils sécrètent des facteurs de croissance capables d'induire la différenciation des cellules épithéliales, ou de favoriser le développement des cellules cancéreuses dans un contexte pathologique [**VonAhrens et al. 2017**].

En cas de lésion tissulaire et/ou d'inflammation, les fibroblastes sont activés et permettent la régénération tissulaire *via* leurs capacités à synthétiser la MEC et leur contractilité élevée. L'activation des fibroblastes initialement quiescents est caractérisée par l'expression de marqueurs tel que l'alpha Actine de Muscle Lisse (α -SMA) impliquée dans la contraction cellulaire, la vimentine, marqueur de transition épithéliomésenchymateuse (TEM), ou encore de molécules d'interaction avec la MEC (ICAM, VCAM, intégrine $\alpha1\beta1$). Du point de vue fonctionnel, les fibroblastes activés cessent de proliférer, et permettent la cicatrisation grâce à la sécrétion de collagène et fibronectine et à leur force contractile développée (Figure 8) [**Kalluri et al. 2016 ; Ohlund et al. 2014**].

On parle alors de WAF (wound-healing associated fibroblast), ce processus d'activation est réversible et, en cas de régénération complète, les fibroblastes activés retournent à l'état quiescent ou sont éliminés par apoptose. Les WAF peuvent également évoluer en CAF (Carcinoma Associated Fibroblasts) dans le cadre du processus de cancérogenèse (Figure 8) [**Kalluri et al. 2016**].

Lorsqu'ils sont en contact avec la tumeur, les CAF, encore appelés fibroblastes « pathologiques », partagent de nombreuses similitudes avec les fibroblastes « normaux » impliqués dans la régénération tissulaire et l'inflammation [**Cirri et al. 2011**]. Néanmoins, les CAF possèdent un phénotype bien différent des WAF, puisqu'ils sont hautement prolifératifs et sécrètent de nombreuses cytokines inflammatoires (Figure 8).

Au cours de la progression tumorale, les CAF subissent des modifications phénotypiques, leur ratio de prolifération augmente, ils favorisent la croissance

tumorale par de nombreux mécanismes et participent à la chimiorésistance [Cirri et al. 2011 ; Whittle et al. 2019].

Ils soutiennent notamment le processus inflammatoire chronique *via* la sécrétion de cytokines inflammatoires, favorisent l'angiogénèse, le recrutement de CAM et la croissance de la tumeur [Erez et al. 2010]. Les CAF favorisent l'angiogénèse en stimulant les péricytes et les cellules endothéliales, et sont impliqués dans le remodelage et la synthèse de la MEC pathologique [Hanahan et al. 2012]. Les CAF sont caractérisés par l'existence de plusieurs marqueurs tels que l' α -SMA, la tenascine C, la FSP-1 (Fibroblast Specific Protein 1), le NGA (Neural-Glial Antigen) ainsi que la FAP (Fibroblast Activating Protein) (Figure 8) [Augsten et al. 2014].

Stromal Cell Phenotype	Markers Expressed	Aggressiveness
MSC-like	CD105, CD90, CD73, CD44	Least Aggressive
Endothelial-like	CD31	
Myofibroblast-like	Alpha SMA, TnC	More Aggressive
Pericyte-like	NG2, PDGFr	
Matrix-remodeling	FSP1, FAP, alpha SMA-	Most Aggressive

Figure 9) Hétérogénéité phénotypique des CAF :

Les 5 sous-types sont classés en fonction de leur l'agressivité. CD105, CD90, CD73 et CD44 sont des marqueurs de cellules souches mésenchymateuse. Le CD31 est une molécule d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales ; TnC : tenascine C ; NG2 : neuron-gliale antigen 2 ; PDGFr : recepteur au PDGF ; FSP1 : Fibroblast-Specific Protein ; FAP : Fibroblast Activation Protein.

D'après [Bussard et al. 2016].

Le terme de CAF regroupe un nombre important d'acteurs cellulaires au phénotype similaire tels que les fibroblastes, myofibroblastes ou les cellules stellaires. Ces dernières sont tissu spécifique, puisqu'elles sont uniquement retrouvées dans le foie et le pancréas, et sont alors appelées Cellules Stellaires Hépatiques (CSH) ou Cellules Stellaires Pancréatiques (CSP). Néanmoins les travaux récents tendent à différencier les types cellulaires de la famille des CAF en apportant une nomenclature plus précise et en permettant une meilleure caractérisation des

marqueurs spécifiques à chaque sous-type (Figure 9). Ainsi, 5 sous-types de CAF ont été identifiés et caractérisés en fonction des marqueurs qu'ils expriment et de leur niveau d'agressivité. Les « MSC-like » (Mesenchymal Stem Cell like), correspondant au phénotype faiblement agressif, les « endothelial like », les « myofibroblast like », « les pericytes like » et les plus agressives, les CAF dites « matrix remodelling » (Figure 9)[**Kidd et al. 2012 ; Spaeth et al. 2013 ; Bussard et al. 2016 ; Whittle et al. 2019**].

CHAPITRE 3) LES CELLULES STELLAIRES PANCREATIQUES :

I) Les cellules stellaires pancréatiques dans l'ACP :

L'importance du MET dans la progression cancéreuse et la genèse des métastases a été mise en évidence dans de nombreux cancers solides, parmi lesquels, les cancers mammaires, pulmonaires, rénaux, prostatiques, hépatiques (CHC), ou encore pancréatiques (ACP) [**Quail et al. 2013**].

Bien que le stroma tumoral impacte le développement de nombreuses tumeurs solides, il est à noter que les cancers présentant une réaction desmoplastique (RD) très importante sont l'ACP et le carcinome hépatocellulaire (CHC) [**Carloni et al. 2014 ; Whitcomb et al. 2009**]. Le foie et le pancréas sont également les seuls tissus de l'organisme exprimant des cellules stellaires (CS), et de nombreuses études prouvent le rôle primordial joué par ces cellules dans l'activation du MET et la progression cancéreuse [**Carloni et al. 2014 ; Allam et al. 2017 ; Farran et al. 2019 ; Whittle et al. 2019**]

L'ACP est un cancer dans lequel le MET est extrêmement développé et réactif [**Allam et al. 2017 ; Farran et al. 2019 ; Whittle et al. 2019**]. L'importance du MET dans le développement de ce type de cancer est directement lié à la présence des CSP. Le rôle primordial des CSP dans la RD et *in fine* dans la progression tumorale

de l'ACP fait actuellement consensus [**Apte et al. 2004 ; Allam et al. 2017 ; Farran et al. 2019 ; Whittle et al. 2019**].

Le MET régit également la progression cancéreuse *via* des paramètres physiques et biochimiques tels que la pression, le pH, ou encore l'hypoxie. Il est à noter que les paramètres précédemment cités influencent également l'activation des CSP de même que les autres éléments cellulaires du MET. Le MET est donc le siège de réactions en chaîne touchant tous ses composants ainsi que la tumeur, et favorisant le développement global de l'ACP et de son stroma [**Masamune et al. 2002 ; Kikuta et al. 2006 ; Masamune et al. 2010 ; Feig et al. 2012**].

II) Caractérisation des CSP :

Le terme de cellule stellaire est apparu avec l'isolation des premières Cellules Stellaires Hépatiques (CSH) identifiées par Karl Wilhelm Kupffer comme des « phagocytes » en 1876 [**Kupffer, 1876**]. Près d'un siècle plus tard, en 1971, Wake les identifia sous le terme de CSH [**Wake, 1971**], dénomination validée en 1996 et toujours employée de nos jours [**Ahern et al. 1996**]. Les CSP, quant à elles, ne furent isolées qu'en 1982 sur la souris [**Watari et al. 1982**] puis sur le rat, et enfin l'homme [**Ikejiri et al. 1990**]. Néanmoins, l'étude de leur impact sur la fibrose et la RD n'a pu être envisagée qu'après culture primaire de CSP isolées sur le rat et l'homme [**Apte et al. 1998 ; Bachem et al. 1998**], puis suite à la création en 2005 d'une lignée cellulaire humaine de CSP, la lignée RLT-PSC [**Jesnowski et al. 2005**].

Une étude comparative utilisant des micropuces à ADN a permis de montrer qu'il n'existe que 29 gènes sur 23 000, qui diffèrent entre les CSP et les CSH humaines, soit 0,1% de différence génétique [**Buchholz et al. 2005**].

Dans le pancréas sain, les CSP sont localisées dans l'espace périacinaire situé autour des acini pancréatiques, et ne représentent que 4 à 7% de l'ensemble de la population cellulaire du pancréas (Figure 10). Elles sont impliquées dans le maintien de l'intégrité tissulaire en régulant le turnover de la MEC par la sécrétion de MMP et TIMP [Phillips *et al.* 2003a]. Les CSP conditionnent également la formation et la différenciation des acini en régulant leur adhésion à la membrane basale via l'intégrine $\beta 1$ [Riopel *et al.* 2013 ; Arcangeli *et al.* 2014]

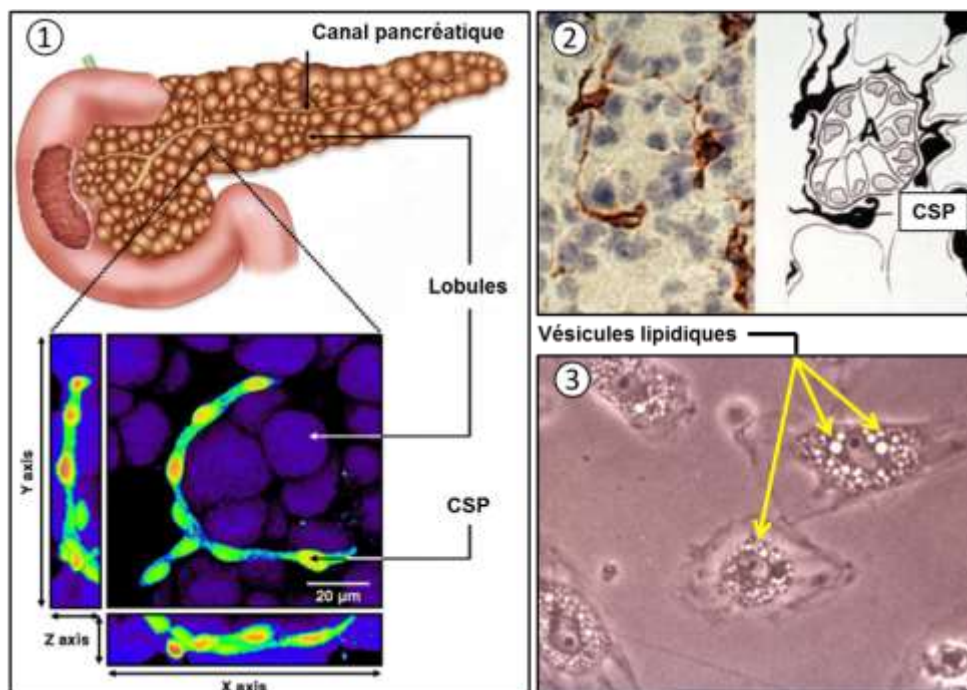


Figure 10) Les CSP dans le pancréas physiologique :

Localisation des CSP dans le pancréas sain : 1) Localisation des CSP (marquage en pseudocouleur jaune) en périphérie des lobules acinaires pancréatiques. 2) Marquage de la desmine (marron), protéine du cytosquelette constituant un marqueur de CSP, localisée autour des acini (A) pancréatiques sur tissu sain. 3) Les CSP quiescentes issues de culture primaire exhibent de nombreuses vésicules lipidiques cytoplasmiques.

Modifié d'après [Apte *et al.* 2012 et Ferdek *et al.* 2017]

Les CSP quiescentes sembleraient également jouer un rôle d'éboueur dans le pancréas à l'instar des cellules de Kupffer hépatiques. En effet celles-ci sont capables de phagocyter les débris cellulaires, les corps apoptotiques et les macrophages en fin de vie, permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire du pancréas **[Shimizu et al. 2005]**.

Avant d'être activées par un contact prolongé avec la tumeur, les CSP sont dans un état quiescent. Cet état est caractérisé par une grande concentration de gouttelettes lipidiques contenant de la vitamine A (rétinol) dans le cytoplasme des CSP (Figure 10). Elles expriment également la desmine, la vimentine et la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP). La desmine et la GFAP, appartenant aux filaments intermédiaires du cytosquelette, sont considérées comme des marqueurs de CSP exprimés à la fois à l'état quiescent et à l'état activé (Figure 11) **[Ding et al. 2009]**. La présence de gouttelettes lipidiques formant des stocks de rétinol est le seul marqueur de quiescence actuellement attesté pour les CSP, contrairement aux CSH qui expriment également la vinculine et la cytoglobine **[Nielsen et al. 2017]**. Les gouttelettes lipidiques contiennent une grande quantité d'adipophiline et les CSP quiescentes sont spécifiquement ciblées dans les tissus de patients *via* l'utilisation d'un anticorps anti-adipophiline **[Nielsen et al. 2017]**.

Suite à un traumatisme (lésions, états inflammatoires) ou dans le cadre du développement de l'ACP, les CSP acquièrent un phénotype activé, caractérisé par la perte de leurs stocks lipidiques en vitamine A et l'expression de l' α -SMA (Figure 11). A l'instar des fibroblastes et myofibroblastes, l'activation « traumatique » des CSP est un processus réversible intervenant dans le cadre de la réparation tissulaire et du maintien de l'architecture de l'organe.

Par opposition, une activation des CSP médiée par les cellules cancéreuses est un processus irréversible *in vivo*, puisqu'elles restent en contact avec la tumeur.

Il est à noter que les CSP adoptent un phénotype activé en seulement 48h lorsqu'elles sont en culture, et qu'il est par conséquent très difficile de travailler sur des CSP quiescentes *in vitro* **[Apte et al. 1998 ; Bachem et al. 1998]**.

III) Activation des CSP :

Le processus d'activation des CSP se traduit par 1) la perte des vésicules lipidiques contenant le rétinol et constituant l'unique marqueur de quiescence, 2) l'expression de la protéine du cytosquelette α -SMA, 3) une réorganisation du cytosquelette aboutissant à l'acquisition d'un phénotype « stellaire », 4) des propriétés prolifératives, migratoires et sécrétoires accrues (Figure 11) [Apte *et al.* 1998 ; Bachem *et al.* 1998].

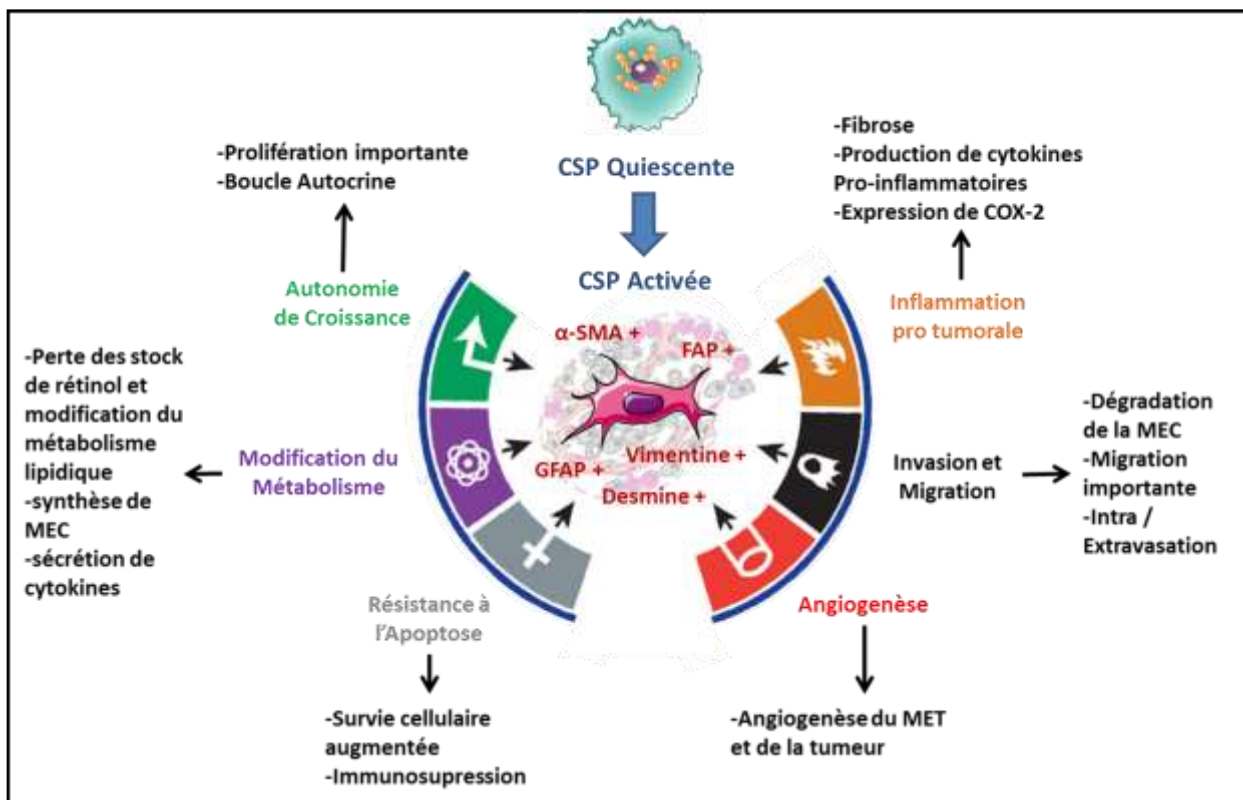


Figure 11) Caractéristiques de la CSP activée :

Caractéristiques des CSP activées et analogie avec la cellule cancéreuse :

Les CSP activées sont caractérisées par l'expression de la FAP et de l' α -SMA, elles expriment également les marqueurs de CSP : vimentine et desmine. Les caractéristiques fonctionnelles des CSP activées sont symbolisées par le modèle développé par Hanahan et Weinberg (2011) afin de souligner l'analogie avec le phénotype de la cellule tumorale. Ainsi, les CSP activées favorisent l'inflammation, l'angiogenèse, la survie, elles migrent et envahissent le MET, acquièrent une certaine autonomie proliférative *via* la mise en place d'une communication autocrine et subissent des modifications métaboliques importantes.

Créé en utilisant [Hanahan et Weinberg, 2011] et Servier Medical Art.

1) Perte de l'état de quiescence :

Les vésicules lipidiques contenant la vitamine A disparaissent avec l'activation des CSP suggérant le rôle du rétinol dans le maintien de la quiescence (Figure 11). McCaroll et collaborateurs ont démontré en 2006 que l'expression du rétinol et de ses métabolites ATRA (All Trans Retinoic Acid) inhibent l'induction de l'expression de α -SMA et le niveau d'activation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Le rétinol induit également la quiescence des CSP activées en culture, réduit leurs capacités prolifératives ainsi que l'effet protecteur des CSP sur l'apoptose des cellules d'ACP [McCaroll *et al.* 2006 ; Fieke *et al.* 2011]. Il existe un lien important entre l'état de quiescence des CSP et les acteurs du métabolisme lipidique tels que le rétinol ou l'adipophiline, protéine exprimée dans les vésicules lipidiques [McCaroll *et al.* 2006 ; Fieke *et al.* 2011 ; Nielsen *et al.* 2017]. Suivant cette hypothèse, des travaux ont été réalisés sur le rôle de PPAR- γ dans le maintien du phénotype quiescent des CSP. PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) est un récepteur nucléaire de la famille des PPAR, acteur majeur du développement des adipocytes. Il peut former des hétérodimères avec le récepteur du rétinol et engendrer la transcription de gènes cibles impliqués dans la différenciation adipocytaire. Les ligands de PPAR- γ proviennent du métabolisme des lipides polyinsaturés et il est impliqué, entre autres, dans la régulation de la prolifération cellulaire [Tontonoz *et al.* 2008]. De par son rôle dans le métabolisme lipidique, de nombreuses études se sont intéressées à son impact sur le maintien de la quiescence des CSP [Masamune *et al.* 2002 ; Jaster *et al.* 2005]. Il a notamment été montré que l'activation de PPAR- γ inhibe la prolifération, la production de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) de collagène et l'expression de α -SMA dans les CSP [Jaster *et al.* 2005]. De plus, l'induction de PPAR- γ par un antagoniste inhibe la formation de fibrose pancréatique sur des modèles de rat et souris développant spontanément des pancréatites chroniques [Shimizu *et al.* 2002 ; Van Westerloo *et al.* 2005].

La perte de l'état de quiescence constitue en cela un véritable marqueur d'activation (Figure 11). Les états quiescents et activés sont antagonistes et ne sont pas irréversibles. Il est possible d'induire la quiescence des CSP activées *in vitro*, néanmoins il existe très peu de résultats allant dans le sens d'une « désactivation » du MET *in vivo*.

2) Expression de l'alpha actine de muscle lisse (α -SMA) :

L' α -SMA est une protéine du cytosquelette dont l'expression est caractéristique des CMLV, myofibroblastes et cellules stellaires activées (Figure 11). Il s'agit d'une protéine de 42 kDa synthétisée sous forme globulaire, pouvant s'associer aux fibres de myosine et d'actine, notamment l'actine fibrillaire. Le gène codant pour l' α -SMA, *ACTA-2*, est situé sur le chromosome 10 aux *loci* 22 et 24, des mutations de ce gène conduisent à de nombreuses pathologies telles que l'anévrisme, l'hypertrophie aortique ou le cancer [Milevicz *et al.* 2010]. De manière générale, toute modification de la synthèse d' α -SMA conduit à des troubles pathologiques au cours desquels l'homéostasie matricielle est rompue, on peut citer le cas des fibroses tissulaires ou de la réaction desmoplastique (Figure 14) [Cherng *et al.* 2008].

L' α -SMA confère aux CMLV des propriétés contractiles indispensables au maintien du tonus vasculaire [Schildmeyer *et al.* 2000] et constitue la principale source du pouvoir contractil des myofibroblastes [Hinz *et al.* 2001].

Le processus d'activation constituant l'acquisition d'un profil myofibroblastique est caractérisé par la synthèse d' α -SMA aboutissant à une diminution de la prolifération cellulaire. L'expression de l' α -SMA, et son incorporation aux fibres de stress confèrent également aux myofibroblastes (et/ou CSP) des propriétés contractiles élevées, et permet d'augmenter leurs capacités de synthèse des composants de la MEC [Kalluri, 2016].

L'acquisition d'un phénotype myofibroblastique s'effectue lors de la réaction de fibrose ayant lieu dans le cadre du processus de régénération tissulaire (wound-healing). Au cours de la réaction fibrotique, les myofibroblastes et/ou les CSP permettent la réparation des lésions grâce à leur force de contraction élevée et la régénération des tissus lésés en néosynthétisant la MEC [Kalluri, 2015 ; Apte *et al.* 2002].

Au-delà de son statut de marqueur d'activation fibroblastique, l' α -SMA est donc avant tout un marqueur de contractilité cellulaire. Les fibroblastes et cellules stellaires subissent donc une transition vers un phénotype musculaire lisse lorsqu'elles sont activées [Kalluri, 2015 ; Apte *et al.* 2002].

A l'instar des fibroblastes, les cellules stellaires participent à la régénération tissulaire par des mécanismes similaires et expriment l' α -SMA lorsqu'elles sont activées par la fibrose. L' α -SMA constitue l'unique marqueur d'activation des CS, et elle est par conséquent très étudiée dans le cadre de la fibrose hépatique comme pancréatique [Apte *et al.* 2004 ; Allam *et al.* 2017 ; Farran *et al.* 2019 ; Whittle et Hingorani 2019

L' α -SMA est le marqueur des CMLV contractiles et non prolifératives [Chen *et al.* 2016]. Il a été démontré que l'augmentation de l'expression de α -SMA dans les CMLV réduit la prolifération cellulaire en diminuant l'expression de Rac1 (protéine G « Ras related »). L'utilisation d'un si-SMA augmente la prolifération des CMLV en augmentant l'expression de Rac1 [Chen *et al.* 2016].

Il a été démontré sur des CSP activées, comme sur des myofibroblastes, que le niveau d'expression de α -SMA varie beaucoup d'une cellule à l'autre [Bussard *et al.* 2016 ; Kalluri 2016 ; Öhlund *et al.* 2017]. L'expression de ce marqueur est indissociable du phénotype activé et totalement absente à l'état quiescent. Néanmoins, le niveau d'expression de α -SMA semble diminuer à mesure que les capacités prolifératives des CSP augmente [Öhlund *et al.* 2017 ; Neuzillet *et al.* 2019].

L'activation des fibroblastes en myofibroblastes, dans le cas du processus de régénération tissulaire, passe par la stimulation par le TGF- β qui induit l'expression de α -SMA et augmente la contractilité des cellules [Yannas *et al.* 2001 ; Tomasek *et al.* 2002].

Le TGF- β 1 est un des principaux régulateurs de la fibrose pancréatique et de la synthèse de α -SMA par les CSP (Figure 12) [Neuzillet *et al.* 2014]. La fixation du TGF- β 1 engendre l'hétérodimérisation du récepteur membranaire appartenant à la famille des RTK (Récepteurs Tyrosine Kinase), et induit l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la principale est la voie des Smad. Le récepteur au TGF- β 1 activé par son ligand phosphoryle Smad2 et Smad3 qui forment alors des oligomères avec Smad4. La translocation du complexe Smads dans le noyau, transitant par des endosomes, aboutit à la transcription de gènes cibles, parmi lesquels ACTA2 (ACTin Alpha 2) [Neuzillet *et al.* 2014]. En fonction des isoformes de récepteurs au TGF- β impliqués, il peut y avoir activation des protéines Smad1, 5 et 8. La signalisation intracellulaire du TGF- β 1 comporte une voie principale, ou

« canonique » : la voie Smad, mais peut également stimuler des voies annexes, telles que la voie ERK1/2 (Figure 12) **[Aoki et al. 2007 ; Neuzillet et al. 2014]**.

Le TGF- β régule une grande variété de fonctions dans les CSP, dont la sécrétion de composants de la MEC, l'activation, la synthèse de α -SMA, mais induit également une diminution de la prolifération cellulaire et une réduction de la synthèse de MMP-3 et 9 **[Shek et al. 2002]**. L'inhibition de Smad2 et 3 induit une diminution de l'activation des CSP mais augmente leur capacités prolifératives en réponse au TGF- β 1. De plus, le TGF- β 1 stimule sa propre synthèse en augmentant la transcription des ARNm du TGF- β 1 par les CSP *via* la voie ERK1/2 **[Ohnishi et al. 2004]**. Ces résultats montrent également que l'effet anti-prolifératif et pro-fibrotique du TGF- β 1 est exclusivement médié par les isoformes 2 et 3 de Smad (en association avec ERK1/2 pour l'aspect non-canonique) dans les CSP et non Smad1, 5 et 8 **[Ohnishi et al. 2004]**. Il a été démontré que le TGF- β 1 exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des CSH *via* Smad3, que Smad3 permet d'augmenter la synthèse de collagène de type I mais pas l'expression de α -SMA **[Schnabl et al. 2001]**. L'effet anti-prolifératif du TGF- β 1 est également médié par Smad2 et 3 dans les fibroblastes murins **[Piek et al. 2001]**.

Le TGF- β 1 est capable d'exercer de multiples effets sur les CSP *via* l'activation des voies canonique et non-canonique en parallèle.

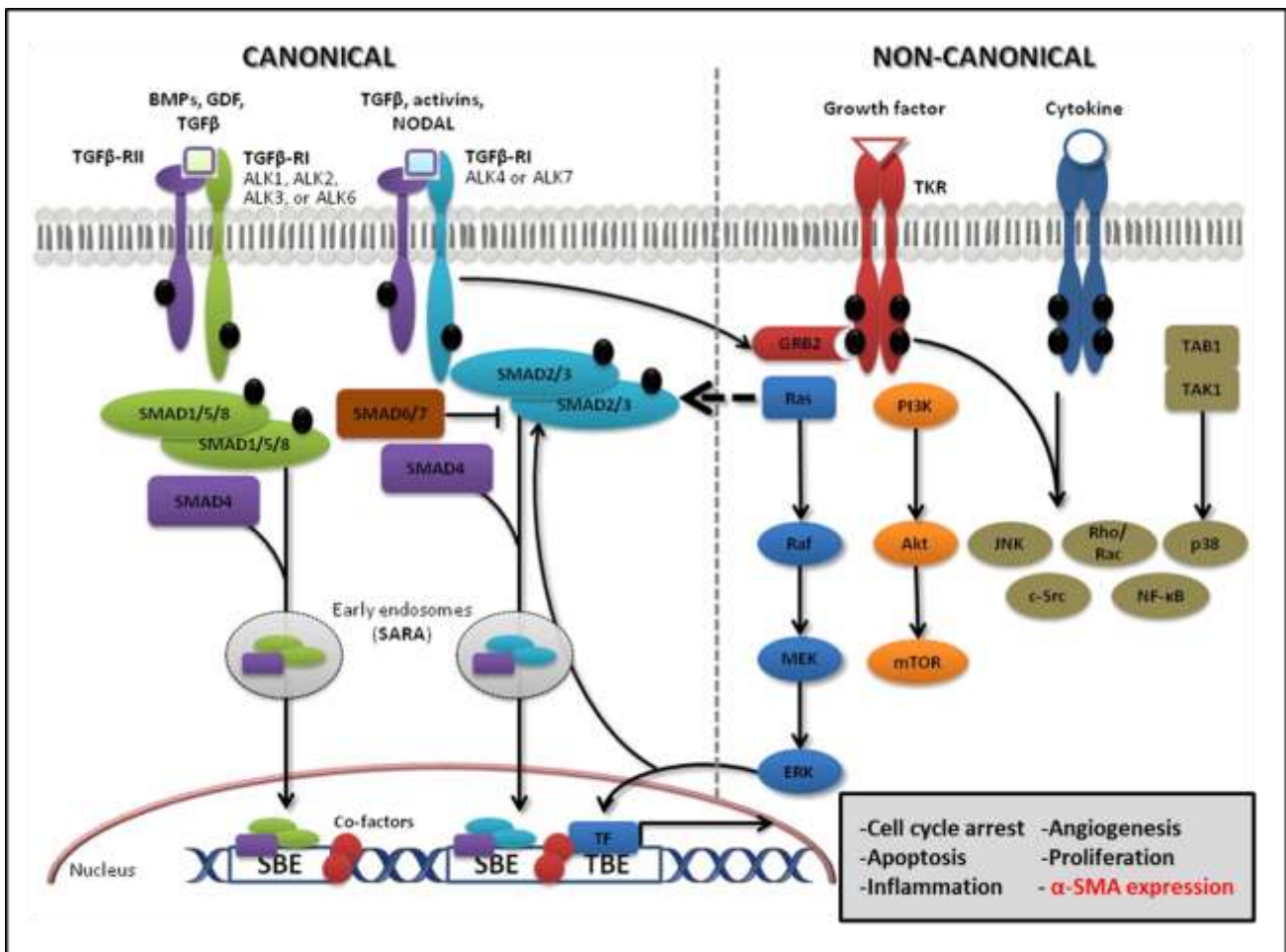


Figure 12) Voie de signalisations canonique et non-canonique du TGF-β:

Le TGF-β est le facteur fibrotique majeur de la RD dans l'ACP, sa fixation au TGF-β-RI et RII (RTK) induit la phosphorylation des Smad. La voie non canonique implique notamment l'activation de la voie des MAPK, ERK1/2. Les gènes transactivés par les facteurs Smad ayant effectué la translocation nucléaire induisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'expression de α-SMA ou encore l'angiogenèse. Avec : « SBE » : Smad binding element ; « SARA » : protéine nécessaire à la mise en place des endosomes de smad ; « TKR » : tyrosin kinase receptor ; « TF » : transcription factor.

Modifié d'après [Neuzillet *et al.* 2014].

3) Acquisition d'un phénotype stellaire :

Pendant le processus d'activation, les CSP subissent une importante réorganisation du cytosquelette, impliquant notamment une augmentation de la formation des fibres de stress nécessaires au processus dit de « stellation » (Figure 11)[Masamune *et al.* 2003a]. La voie Rho/Rho kinase est un régulateur connu de la morphologie cellulaire

et de la polymérisation de l'actine [Takai *et al.* 1995]. Lorsque les CSP sont traitées avec un inhibiteur de Rho kinase (Y-27632), elles perdent l'aspect étoilé qui les caractérise au profit d'une morphologie fusiforme, et présentent une rupture de l'assemblage des fibres de stress [Masamune *et al.* 2003a]. Ces effets sont accompagnés d'une diminution de la prolifération cellulaire, de l'expression de α -SMA, et de la production de collagène de type I par les CSP. De plus, l'inhibition de Rho-kinase engendre une diminution de la contraction et de la migration des CSP en réponse à l'endothéline-1 [Masamune *et al.* 2005]. Il a également été démontré que l'effet contractile induit par l'endothéline-1 génère une augmentation de l'expression d' α -SMA et de RhoA [Yamakawa *et al.* 2000]. L'ECM est étroitement liée au processus de contraction cellulaire par l'intermédiaire de l'adhésion focale des cellules à la matrice. L'adhésion focale contribue à la formation des fibres de stress qui génèrent et transmettent la force contractile des cellules [Burridge *et al.* 1996 ; Tomasek *et al.* 2002 ; Hojeong *et al.* 2011]. La contraction des fibres de stress passe par l'activation de 2 systèmes de kinases : MLCK (myosin light chain kinase) générant la contraction rapide des fibres et Rho-kinase engendrant un effet contractile soutenu [Katoh *et al.* 2001]. Ces données suggèrent l'importance de Rho/Rho kinase dans l'activation des CSP et le maintien de la morphologie stellaire, caractéristique de l'activation des CSP.

4) Acquisition d'un phénotype sécrétoire :

Au cours du processus d'activation, les CSP subissent également un certain nombre de transformations phénotypiques majeures. On compte notamment une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire, une production excessive de composants de la MEC ainsi que d'enzymes de remodelage (MMP, TIMP), de même qu'une sécrétion importante de facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires (Figures 11 et 13) [Phillips *et al.* 2003a ; Bachem *et al.* 2005]. Aoki et collaborateurs ont démontré que la Cyclooxygenase 2 (COX-2) était exprimée dans les CSP activées alors que les CSP quiescentes n'expriment que l'isoforme COX-1, par ailleurs exprimée dans de nombreux tissus [Aoki *et al.* 2007]. COX-2 est exprimée dans peu de tissus, néanmoins cette enzyme est très exprimée au niveau des îlots pancréatiques et dans l'ACP. Cette enzyme est impliquée dans les

processus inflammatoires et favorise l'activation des autres acteurs du stroma [Aoki et al. 2007].

De nombreuses études réalisées *in vitro* comme *in vivo* sur modèles murin et humain ont permis de mettre en évidence la nature des facteurs sécrétés par les CSP activées. Il est intéressant de noter que la plupart de ces facteurs sont également synthétisés par les CCP et qu'il existe d'avantage de facteurs en commun entre le sécrétome des CCP et celui des CSP activées, qu'entre les CSP quiescentes et activées [Wehr et al. 2011]. Ces facteurs sont multiples : cytokines, facteurs de croissances, enzymes, composants de la MEC, ou encore ROS (Reactive Oxygen Species).

Le PDGF (Platelet-Derived-Growth-Factor) et le TGF (Transforming Growth Factor) constituent les 2 principaux facteurs activateurs permettant une hausse de la prolifération, de la production de MEC et de MMP, et de la migration cellulaire des CSP [Apte et al. 1999 et 2012 ; Luttenberger et al. 2000 ; Schneider et al. 2001 ; Phillips et al. 2003a; Masamune et al. 2009; Tang et al. 2012 ; Tahara et al. 2013]. D'autres facteurs issus des CSP tels que le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le VEGF (Vascular Endotheliale Growth Factor), le CTGF (Connectif Tissue Growth Factor), l'EGF (Elongation Growth Factor), le FGF (Fibroblasts Growth Factor), les IL-6,8,10 et 15 ou encore le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) soutiennent activement le développement tumoral, la génération de métastases et l'activation des autres types cellulaires du MET [Eguchi et al. 2013 ; Habisch et al. 2010 ; Masamune et al. 2009 ; Masamune et al. 2008a ; Mews et al. 2002

IV) Signalisation cellulaire dans les CSP :

Les CSP activées sont les cellules mésenchymateuses les plus abondantes dans le stroma tumoral de l'ACP, elles prolifèrent rapidement et deviennent le type de CAF majoritaire plaçant les myofibroblastes au second plan. Elles peuvent dépasser en nombre les cellules cancéreuses et représenter plus de 50% de la masse de la tumeur [Apte et al. 2004 ; Lunardi et al. 2014]. Les propriétés prolifératives développées des CSP activées sont liées à l'hyperstimulation de ces dernières. Le MET et ses acteurs sont d'importantes sources de facteurs de croissance et

cytokines favorisant la prolifération, la survie, et la migration des CSP. L'hyperstimulation des CSP conduit à l'activation importante des voies de signalisation intracellulaires dépendantes des facteurs exogènes. Les effets physiologiques induits par une telle stimulation sont multiples, et un facteur isolé peut provoquer l'activation de différentes voies et *in fine* favoriser plusieurs processus cellulaires.

La voie des MAPK est l'une des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stimuli externes chez les mammifères. Cette voie impacte de nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la production de cytokines [Chang *et al.* 2001]. Les différents membres de la voie MAPK, à savoir ERK, JNK et p38 MAPK, sont des éléments centraux de la signalisation intracellulaire en réponse aux facteurs de croissances/cytokines.

La signalisation intracellulaire dans la voie MAPK implique la phosphorylation ainsi que la translocation dans le noyau des différents membres, permettant l'activation de facteurs de transcription comme AP-1 ou NF κ B, et à termes la transcription de gènes cibles [Chang *et al.* 2001].

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie des MAPK a permis de démontrer qu'elles sont indispensables à la synthèse de cytokines et chimiokines par les CSP activées [Masamune *et al.* 2003b et c, et 2008]. Néanmoins, la régulation des processus induits dans les CSP diffère beaucoup en fonction du membre de la famille MAPK impliqué.

Il a été démontré que l'activation de la voie ERK est un phénomène précoce qui précède la synthèse d' α -SMA par les CSP durant le processus d'activation [Jaster *et al.* 2002]. L'activation de la voie ERK est également étroitement liée à la prolifération cellulaire en réponse au PDGF dans les CSP activées [Jaster *et al.* 2002 ; Masamune *et al.* 2003c] ainsi qu'à de nombreux autres stimuli comme la pression, l'angiotensine-II, l'EGF, ou encore la galectine-1 [Hama *et al.* 2004 ; Watanabe *et al.* 2004 ; Masamune *et al.* 2006]. ERK est également impliqué dans la synthèse de MMP-1 suite à une stimulation au TNF- α [Tasaki *et al.* 2003] et dans la sécrétion de TIMP-1 induite par le PDGF présent dans le milieu conditionné de cellules cancéreuses [Yoshida *et al.* 2004].

La voie p38 MAPK est également impliquée dans l'activation des CSP, et l'inhibition de cette dernière empêche l'activation des CSP en culture [Masamune *et al.*

2003b]. De plus p38 MAPK régule la prolifération stimulée par le PDGF **[Masamune et al. 2003b]** ainsi que la synthèse de collagène de type I et d' α -SMA **[McCarroll et al. 2003 ; Kikuta et al. 2004]**.

Enfin, deux études se sont intéressées à l'impact de JNK sur l'activation des CSP, et montrent l'absence d'effet de l'inhibition de JNK sur l'activation des CSP **[Masamune et al. 2004]**, et placent JNK comme régulateur présumé de l'apoptose cellulaire des CSP **[Dhanasekaran et Reddy 2008]**.

En dehors de la voie des MAPK, d'autres voies de signalisation, telles que PI3K Akt et JAK STAT, ont été décrites dans les CSP selon les conditions de stimulation. La voie PI3K Akt est principalement impliquée dans la migration des CSP induite par le PDGF **[Masamune et al. 2003c ; McCarroll et al. 2004]**, et par la périostine **[Erkan et al. 2007]**, et peut-être activée par de nombreuses cytokines telles que TNF- α , IFN- γ pour favoriser entre autres la synthèse de IL-32 α **[Nishida et al. 2008]**.

Dans la voie JAK STAT, les JAK (Janus Activated Kinases) représentent un groupe de tyrosine kinases capable d'activer les facteurs de transcription de la famille STAT par phosphorylation (Signal Transducer and Activator of Transcription). Les facteurs STAT sont cytosoliques latents et transloquent dans le noyau après phosphorylation **[Silva, 2004]**. Il a été démontré que la stimulation des CSP au PDGF-BB induit l'activation de Src, JAK2, STAT1 et 3. L'utilisation d'inhibiteurs de JAK et Src ont permis d'estimer que la voie JAK2/STAT1 et 3 est stimulée par Src en présence de PDGF-BB et favorise la prolifération des CSP **[Masamune et al. 2005b]**. STAT1 est également impliqué dans la réponse à l'IFN- γ et - β **[Baumert et al. 2006]**.

Il a été démontré que l'angiotensine II exerce des effets prolifératifs sur les CSP en bloquant l'inhibition de la prolifération induite par le TGF- β 1 *via* Smad7 et la PKC **[Hama et al. 2006]**. Il existe des boucles de stimulation autocrines dans les CSP, entre le TGF- β 1 et l'IL-1 β médiées par Smad3 et ERK, ainsi qu'entre le TGF- β 1 et l'IL-6 dépendante de Smad2/3 et ERK1/2 également **[Aoki et al. 2006a et b]**.

L'expression de la COX-2, impliquée dans l'activation des CSP, et la réaction à l'inflammation est également induite par une stimulation au TGF- β 1 médiée par une voie dépendante de Smad2/3 **[Aoki et al. 2007]**. La voie Smad est également impliquée dans le remodelage de la MEC puisque la surexpression de Smad3 et 7

diminue l'expression de l'inhibiteur de protéase RECK (REversion Inducing Cysteine rich protein with Kazal motif) [Lee *et al.* 2008].

Inhiber COX-2 diminue également l'expression de PCNA, une protéine nucléaire nécessaire à la synthèse de l'ADN par la polymérase gamma et epsilon, et à la réparation de l'ADN post-réplivative dans les HSP (Hépatique Stellate Cells). PCNA est synthétisée en début de phase G1 et S du cycle cellulaire, et joue dans la croissance cellulaire. Les capacités prolifératives accrues, caractérisant les cellules stellaires activées, semblent ainsi liées à l'expression de COX-2 [Cheng *et al.* 2002].

V) Voies d'activation des CSP :

1) Activation par les facteurs cancéreux :

L'activation des CSP est un processus très dépendant des facteurs sécrétés par les cellules d'ACP (Figure 13). Les CSP répondent également différemment à de nombreuses cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , favorisant la prolifération et la production de collagène, et l'IL-10 générant la production de collagène alors que l'IL-6 induit un effet inhibiteur sur ces deux processus [Mews *et al.* 2002].

Il a été démontré, en lien avec les précédents résultats, que les MAPK et la PI3K constituent les principales voies de signalisation conduisant à l'activation des CSP par les cytokines [Jaster *et al.* 2004 ; Masamune *et al.* 2009b].

La migration cellulaire induite par le PDGF est également dépendante de la voie PI3K-Akt [Masamune *et al.* 2003c ; McCarroll *et al.* 2004], alors que la prolifération induite par le PDGF est médiée par la voie ERK1/2 dans les CSP [Jaster *et al.* 2002 ; Masamune *et al.* 2003c]. D'autres facteurs cancéreux tel que les facteurs de stress oxydatif incluant les ROS, l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène et l'acétaldéhyde induisent l'activation de la voie des MAPK via de nombreux acteurs tel que ERK1/2, p38, JNK, AP-1 (activator protéine 1 transcription factor) de même que certains éléments situés en amont comme PI3K et la PKC [Kikuta *et al.* 2006 ; Masamune *et al.* 2002 ; Masamune *et al.* 2010].

Il existe une autre voie d'activation impliquant ROCK (Rho-associated protein kinase) permettant l'activation des CSP par une réorganisation du cytosquelette d'actine et une augmentation de la migration cellulaire via IHH (Indian HedgHog) [Masamune *et al.* 2003a ; Shinozaki *et al.* 2008]. A l'inverse il existe des facteurs cancéreux répresseur de l'activation des CSP comme PPAR- γ (recepteur peroxisome proliferator-activated receptor gamma) qui agit comme un inhibiteur de la prolifération et de la synthèse de α -SMA [Galli *et al.* 2000].

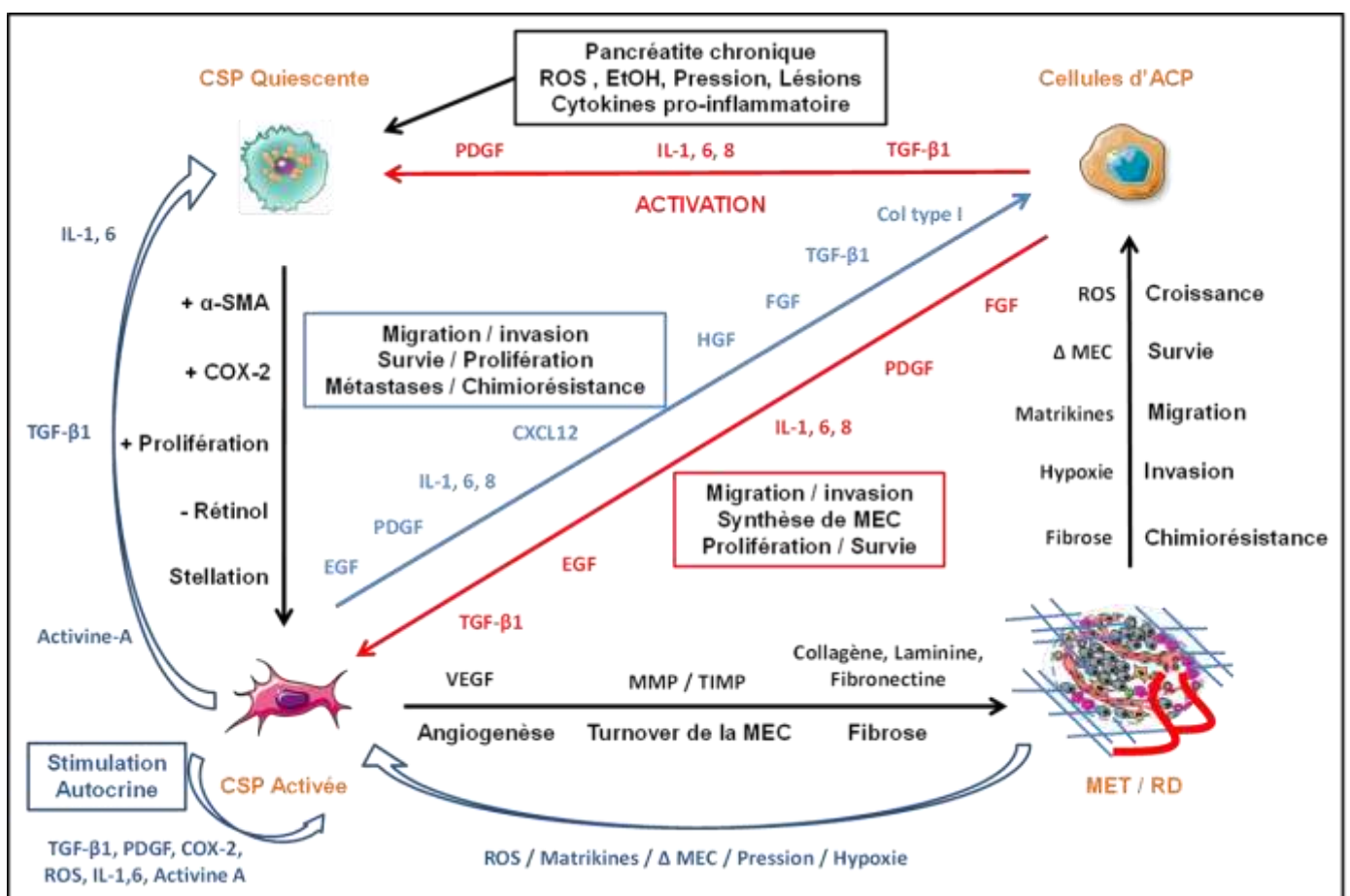


Figure 13) Les CSP dans la réaction desmoplastique de l'ACP:

Représentation du rôle central des CSP dans la Réaction desmoplastique :

La RD est le siège de l'activation des CSP induite par les cellules cancéreuses mais également via d'autres facteurs inflammatoires et traumatiques. Les CSP activées se maintiennent dans cette conformation par la mise en place de boucles de stimulation autocrines. La RD permet une communication complexe entre les CSP, les cellules cancéreuses et les autres acteurs du MET. Concernant la MEC, « Δ » symbolise la variation de composition matricielle.

Créé en utilisant Servier Medical Art

2) Activation par l'Hypoxie

La compression de la tumeur et la pression des fluides interstitiels observées dans l'ACP favorisent l'activation des voies intracellulaires du stress oxydatif, conduisant à une élévation de la sécrétion de TGF- β 1 et de collagène [Asaumi *et al.* 2007 ; Kharraishvili *et al.* 2014 ; Watanabe *et al.* 2004]. Le stress cellulaire et en particulier l'hypoxie joue un rôle primordiale dans la fibrose en activant les CSP [Erkan *et al.* 2009 ; Rebours *et al.* 2013].

L'hypoxie active les CSP et favorise leur migration ainsi que l'expression et la sécrétion de collagène de type I, CXCL12, TGF- β 1, FGF, CTGF, VEGF et MMP. Le tout générant un MET favorable au développement et à la mobilité de l'ACP en activant les mécanismes de migration et invasion cellulaires [Ide *et al.* 2006 ; Masamune *et al.* 2008a; Erkan *et al.* 2009 ; Eguchi *et al.* 2013].

De plus, l'hypoxie induit la sécrétion de VEGF par les CSP ce qui favorise l'angiogénèse tumorale. Il a été démontré que ce processus s'intensifie avec le degré de fibrose du stroma [Erkan *et al.* 2009 ; Masamune *et al.* 2008a ; Kuehn *et al.* 1999].

L'hypoxie favorise également la mise en place d'une inflammation chronique *via* la coopération métabolique entre les CSP et les cellules cancéreuses [Icard *et al.* 2014]. La sécrétion continue de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, 6, 8, 10 et MCP-1) par les CSP ainsi que les cellules d'ACP aboutit au recrutement et à l'infiltration des cellules immunitaires. Le contexte inflammatoire et le MET immunosupresseur qui en découle accélère le développement de l'ACP [Clark *et al.* 2007 ; Yang *et al.* 2013 ; Landskron *et al.* 2014 ; Lunardi *et al.* 2014 ; Wormann *et al.* 2014 ; Yu et Kim 2014]. L'expression de IL-8 et MCP-1 par les CSP contribue en effet au recrutement et à l'accumulation de médiateurs inflammatoires dans le MET et perpétue l'état inflammatoire chronique dans lequel il se trouve [Andoh *et al.* 2000 ; Wehr *et al.* 2011]. Le partenariat entre les CSP et les cellules cancéreuses a constitué l'objet d'étude de nombreux travaux effectués *in vitro* et *in vivo*, qui démontrent tous l'étroite relation bi-directionnelle entre CSP et cellules d'ACP [Haqq *et al.* 2014].

Il a été démontré que l'utilisation de molécules à activité antioxydante, comme les polyphénols, inhibe l'activité et l'activation des CSP [Masamune *et al.* 2002 ;

Masamune et al. 2005]. L'épigallocatechine-3-o-gallate (EGCG), le principal polyphénol contenu dans le thé vert, bloque la prolifération et la migration induites par le PDGF **[Masamune et al. 2005].** L'inhibition de la synthèse de α -SMA, de collagène de type I, et de TGF, ainsi que l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique par les CSP sous l'effet du stress mécanique s'ajoutent à la liste des effets anti-fibrotiques de l'EGCG **[Asaumi et al. 2007].**

3) Activation par l'inflammation chroniques et les états précancéreux :

Avant apparition de la tumeur, les CSP peuvent être activées par une inflammation chronique liée à des lésions précurseurs, ou états pré-cancéreux, comme dans le cadre de pancréatites chroniques récurrentes (Figures 4 et 13) **[Whitcomb 2004a et b ; Whitcomb et Greer 2009].** La pancréatite chronique constitue le principal facteur de risque de l'ACP, il s'agit d'une inflammation du pancréas accompagnée de lésions et d'une fibrose pancréatique. Les patients ayant été atteints de pancréatite chronique durant plus de 5 ans ont 14 fois plus de chance de développer un ACP. De plus, 40% des patients atteints de pancréatites héréditaires développent un ACP de façon certaine **[Whitcomb 2004a et b ; Chu et al. 2007 ; Greer et Whitcomb 2009 ; Whitcomb et Greer 2009 ; Kolodecik et al. 2013].**

Il a été démontré que l'ACP et la pancréatite chronique possèdent une composition de la MEC similaire, indiquant un producteur commun : les CSP activées. Les CSP activées sont très impliquées dans la pancréatite chronique, pathologie se développant avec l'accumulation de collagène fibrillaire de types I et III produits par les CSP. Elles entourent également les PanINs (état pré-néoplasique), prouvant leur activation précoce, et leur rôle primordial dans le développement de l'ACP **[Apte et al. 2004].** La présence de CSP activées à des stades précoces est trahie par un fort marquage pour l' α -SMA autour des PanIN **[Apte et al. 2004].** De plus, un marquage révélant la présence de périostine, facteur uniquement exprimé par les CSP, est visible dans les IPMN montrant l'activation et l'implication précoces des CSP **[Fukushima et al. 2008].**

De plus, les CSP cultivées *in vitro* dans le milieu conditionné de cellules de PanIN isolées sur souris Kras muté, prolifèrent, expriment l' α -SMA, synthétisent la fibronectine et sécrètent d'avantage de MMP [Pandol *et al.* 2012]. Ces résultats indiquent que les cellules pré-néoplasiques peuvent activer les CSP dans les stades précoces de développement du cancer.

Enfin, il a été démontré que les inhibiteurs de la COX-2, type Nimesulide, retardent la progression des lésions précurseurs de l'ACP sur modèle murin génétiquement modifié, signifiant, d'une part que les lésions précurseurs activent les CSP (car seules les CSP activées expriment COX-2), et d'autre part que les CSP activées accélèrent le développement des lésions jusqu'à l'ACP [Yoshida *et al.* 2005].

Le degré d'activation des CSP dépend des étapes inflammatoires chroniques précédant l'apparition du cancer. De ce fait, lorsque les cellules d'ACP entrent en contact avec les CSP, celles-ci se trouvent déjà dans un état d'activation avancée.

VI) Communication des cellules stellaires dans le microenvironnement :

1) Cellules stellaires pancréatiques et matrice extracellulaire :

L'activation prolongée des CSP aboutit à la fibrogénèse par une dérégulation de l'équilibre entre synthèse et dégradation de la MEC. Ces événements débutent par une augmentation de l'expression de collagène (de type I, III et V), de fibronectine, et de laminines par les CSP activées [Apte *et al.* 1999 ; Bachem *et al.* 1998 ; Wehr *et al.* 2011]. Les CSP activées sont présentes dans la zone fibrotique et hypoxique jouxtant l'ACP comme l'a démontré une étude de co-localisation avec HIF-1 α et l'anhydrase carbonique 9 [Couvelard *et al.* 2005 ; Eguchi *et al.* 2013]. Les CSP produisant d'avantage de collagène de type I et V favorisent le phénotype malin des cellules d'ACP [Vaquero *et al.* 2003 ; Apte *et al.* 2004 ; Armstrong *et al.* 2004 ; Wehr *et al.* 2011 ; Berchtold *et al.* 2015]. Le lien existant entre la MEC et les CSP activées n'est pas uni-directionnel. En retour, les composants de la MEC influencent

l'activité des CSP (Figure 11). Le fibrinogène, très présent dans le stroma de l'ACP, induit une hausse de la production de collagène type I, d'IL-6 et 8, de MCP-1 et de VEGF par les CSP **[Masamune et al. 2009]**. De plus, la MEC constitue un immense réservoir de protéines, facteurs de croissance, et autres cytokines enchâssées dans les fibres matricielles. La libération de ces facteurs, durant le turnover de la MEC, favorise l'activité des CSP et des cellules cancéreuses. De nombreuses études ont démontré que ce sont les CSP activées, bien plus que les cellules d'ACP, qui sont responsables du turnover matriciel. Effectivement, les CSP représentent la source majeure de sécrétion de MMP et TIMP, principalement les MMP-2, 9, 12 et 13 et les TIMP-1 et 2 **[Phillips et al. 2003a]**. Les capacités sécrétoires des cellules d'ACP sont bien moins importantes, il a d'ailleurs été rapporté que la sécrétion de MMP-2 par les CSP activées dépassait de très loin celle des cellules cancéreuses **[Ellenrieder et al. 2000 ; Phillips et al. 2003a ; Yoshida et al. 2004 ; Bachem et al. 2005 ; Schneiderhan et al. 2007 ; Erkan et al. 2009 ; Farrow et al. 2009]**.

Néanmoins, les MMP synthétisées par les CSP comme par les cellules d'ACP ne semblent pas constituer des cibles efficaces puisque leur inhibition conduit à une augmentation de la migration cellulaire **[Friedl and Wolf 2009a ; Kessenbrock et al. 2010 ; Mierke 2012]**.

Ainsi, les CSP exercent également un impact indirect sur le développement de l'ACP *via* le remodelage matriciel. La MEC ainsi remodelée favorise directement la progression tumorale **[Werfel et al. 2013]**.

2) Cellules stellaires pancréatiques et Cellules d'ACP :

Dans l'ACP, les CSP sont impliquées à tous les niveaux du développement tumoral. Elles favorisent notamment la croissance rapide de la tumeur dans les premières phases de contact et accélère le développement tumoral et l'acquisition de propriétés métastatiques (Figure 14).

De nombreuses études *in vitro* portant sur la communication entre les cellules cancéreuses et les CSP emploient la technique de milieu conditionné permettant la mise en contact d'un type cellulaire avec les facteurs sécrétés par le deuxième.

Il a été démontré que cultiver des CSP dans des milieux conditionnés (MC) de cellules cancéreuses de la lignée Panc-1 augmente l'expression de COX-2, induisant une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose des CSP. Les milieux conditionnés engendrent également une augmentation de la migration et de l'invasion des CSP et favorisent l'angiogenèse. Lorsque la voie RAS/MAPKinase est inhibée dans les CSP, les MC de Panc-1 ne génèrent plus d'augmentation d'expression de la COX-2. Cette dernière favorise également la croissance tumorale dans l'ACP, puisque lorsqu'elle est inhibée, la fibrose et le développement de la tumeur sont moins importants [Yoshida *et al.* 2005 ; Schneiderhan *et al.* 2007 ; Erkan *et al.* 2009 ; Farrow *et al.* 2009]. Les cellules d'ACP stimulent la sécrétion de VEGF par les CSP, ce qui favorise la néoangiogénèse [Erkan *et al.* 2009 ; Masamune *et al.* 2008] et induit l'expression de la COX-2 sur les CSP, COX-2 étant impliquée dans la boucle autocrine des CSP et donc dans l'entretien de leur activité (Figures 11, 13 et 14)[Yoshida *et al.* 2005 ; Aoki *et al.* 2007].

Une augmentation de la sécrétion de CTGF par les CSP activées par l'hypoxie favorise l'invasion des cellules d'ACP [Eguchi *et al.* 2013] et une inhibition du CTGF induit des effets chimiothérapeutiques [Neesse *et al.* 2013].

Le sphingolipide S1P (Sphingosine 1 Phosphate) active les CSP qui sécrètent la MMP-9, ce qui accroît la migration et l'invasion des cellules d'ACP *in vitro*. Cibler la voie de signalisation du S1P permet de diminuer la croissance tumorale ainsi que le nombre de métastases *in vivo* sur greffe orthotopique d'ACP [Bi *et al.* 2014].

Les cellules d'ACP stimulent la prolifération, la migration et la synthèse de protéines matricielles des CSP majoritairement *via* la sécrétion de PDGF, TGF- β 1 et FGF-2 [Apte *et al.* 2004 ; Bachem *et al.* 2005 ; Bachem *et al.* 2008 ; Vonlaufen *et al.* 2008] En retour, les CSP stimulent la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules d'ACP [Bachem *et al.* 2005 ; Bachem *et al.* 2008 ; Hwang *et al.* 2008].

La communication entre les CSP et les cellules d'ACP a également été évaluée sur des modèles de co-culture. L'interaction directe entre CSP et cellules d'ACP constitue également un facteur activateur. Des co-cultures de CSP et cellules d'ACP

augmentent significativement la prolifération cellulaire des cellules d'ACP comparé à des expériences de mise en contact des cellules d'ACP avec des milieux conditionnés de CSP. Cet effet est lié à l'activation par contact cellulaire de la voie Notch [Hruban *et al.* 2006 ; Fujita *et al.* 2009 ; Mazur and Siveke, 2012]. Il existe donc un autre niveau d'interaction, interaction physique directe, entre les CSP et les cellules d'ACP.

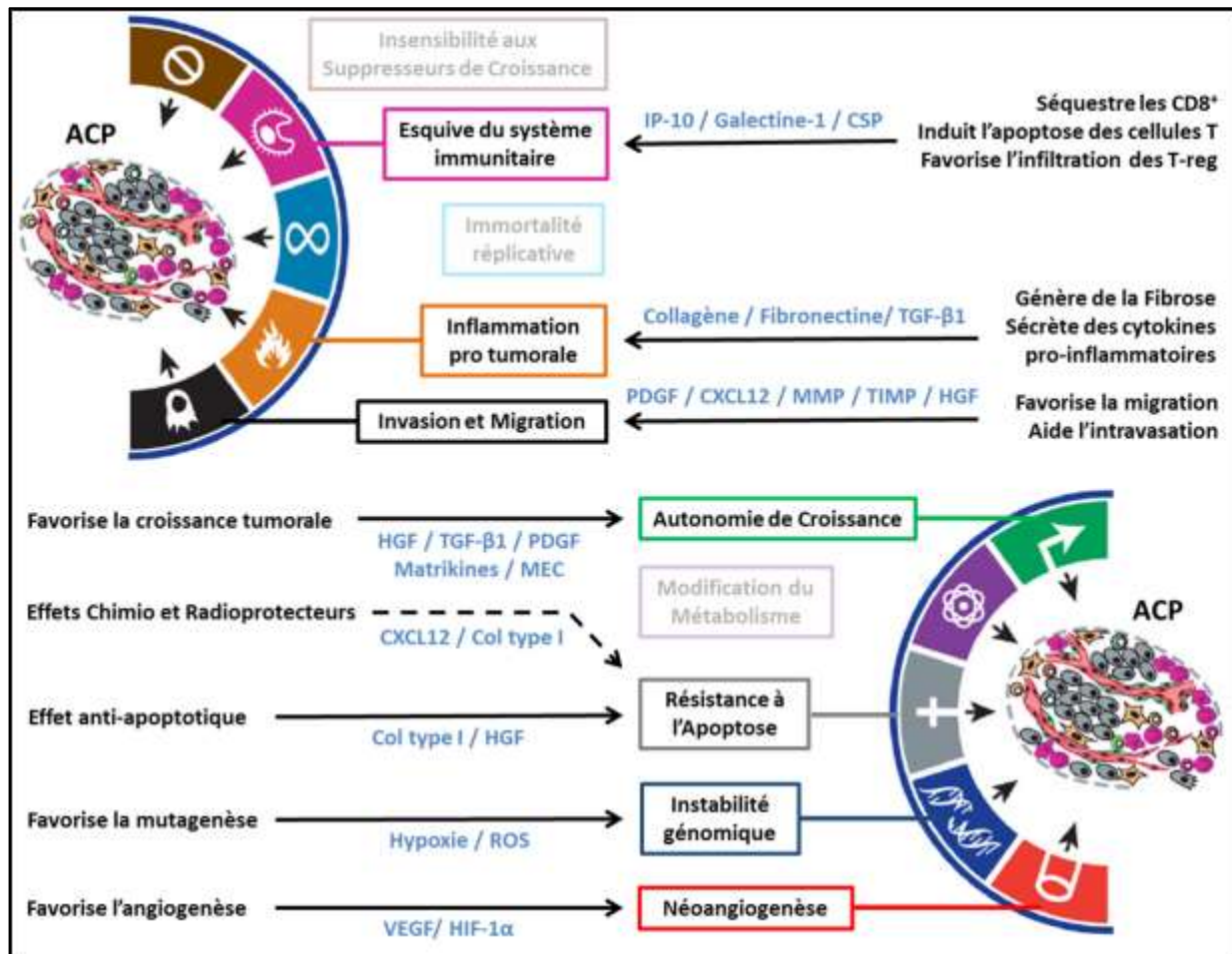


Figure 14) Influences des CSP sur les mécanismes de la cellule cancéreuse :

Les CSP exercent des effets renforçant sur les principales caractéristiques de la cellule cancéreuse, elles favorisent le développement de métastases, l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire tumorale, elles participent également à la mise en place d'un environnement inflammatoire et mutagène. Les CSP ont une action directe via des facteurs sécrétés ou une interaction physique (« CSP »), mais également indirect via la MEC.

Créé en utilisant [Hanahan et Weinberg, 2011].

Des résultats similaires sont retrouvés sur modèles animaux. Il a été démontré que la co-injection de CSP et cellules d'ACP sur modèle murin de xéno greffe orthotopique génère des tumeurs plus grosse avec une RD plus développé, une expansion régionale et une invasion métastatique plus importante comparé à une inection de cellule d'ACP seul **[Bachem et al. 2005 ; Hwang et al. 2008 ; Vonlaufen et al. 2008a]**. Dans des modèles de xéno greffes similaire, il a été démontré que les CSP accélèrent le développement de la tumeur *via* une sécrétion élevée de MMP-2 **[Schneiderhan et al. 2007]**.

La contribution des CSP au développement de l'ACP ne se résume pas aux stades précoces. Ainsi, il a été démontré que les CSP sont en mesure de co-métastaser avec les cellules d'ACP au cours des stades tardifs (Figure 14). On retrouve effectivement la présence de CSP sur des sites métastatiques très éloignés de la tumeur primaire. Des travaux ont permis de démontrer que les CSP sont capables de pénétrer et de sortir de la circulation par intra et extravasation **[Xu et al. 2010]**.

D'après ces observations, les CSP pourraient servir de guide aux cellules invasives à travers la matrice du MET, et améliorer leur survie dans le compartiment sanguin **[Friedl et Wolf 2009 ; Gaggioli et al. 2007]**. Certains groupes de recherche ont proposé une réadaptation de la théorie de la graine et du sol initialement développée par S. Paget en 1889 **[Paget et al. 1889]** pour expliquer l'orientation des métastases vers une cible tissulaire précise. Dans cette explication, la cellule d'ACP correspond à la graine pour qui le sol (le MET) est désigné par la CSP faisant office de « jardinier » **[Gupta et al. 2006 ; Sleeman et al. 2012]**.

De plus, il a été démontré que les Milieux Conditionnés (MC) de CSP cultivées en conditions hypoxiques induisent la prolifération, et la migration des cellules endothéliales, ainsi que l'angiogenèse *in vitro* (possiblement *via* le VEGF) **[Xu et al. 2010]**. Les sécrétions des CSP, lorsqu'elles se retrouvent en condition d'hypoxie, ont été caractérisées. Ainsi, en plus du VEGF, les CSP sécrètent le FGF-2, l'angiopoietine-1, la périostine et HIF-1 (Hypoxia Induced Factor 1) ces facteurs étant connus pour favoriser l'angiogenèse (Figure 14) **[Erkan et al. 2009]**. Malgré cela, des travaux récents indiquent que même en condition normoxique, les CSP favorisent l'angiogenèse tumorale. Effectivement, les cellules microvasculaires

génèrent une structure tubulaire (mécanisme angiogénique) lorsqu'elles sont en contact avec un MC de CSP cultivées en normoxie **[Xu et al. 2014]**.

Les CSP favorisent également la survie des cellules cancéreuses dans de nombreux contextes. Plusieurs études démontrent notamment les effets anti-chimiothérapeutiques exercés par les CSP dans le cadre de traitements anti-cancéreux. Ainsi, il a été démontré que le milieu conditionné de CSP favorise la résistance à la gemcitabine et aux radiations par les cellules d'ACP **[Hwang et al. 2008]**. De plus, les CSP exercent des effets chimio et radioprotecteurs sur les cellules d'ACP, effets médiés par l'intégrine- β 1 et la FAK (Focal Adhesion Kinase). Effectivement, traiter les CSP avec des siRNA combinés contre l'intégrine- β 1 et FAK lève l'effet protecteur sur les CCP et les rend sensibles aux traitements chimio et radiothérapeutiques **[Mantoni et al. 2011]**.

Les CSP favorisent également la rechute de l'ACP en induisant l'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses (Nestine, ABCG2, LIN28) par les CCP. Les cellules souches cancéreuses étant plus résistantes aux traitements, elles favorisent la rechute, et permettent la survie de la tumeur **[Hamada et al. 2012]**. De façon intéressante, Mato et collaborateurs ont démontré que les cellules pancréatiques de rat exprimant un profil de cellule progénitrice (exprimant le marqueur de cellule souche ABCG2) ont une morphologie de CSP avec expression de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques **[Mato et al. 2009]**.

Les CSP ont un effet protecteur sur les cellules d'ACP dans le contexte de traitements radio ou chimiothérapeutiques, en favorisant la résistance ou la rechute. Mais, elles exercent également des effets immunosupresseurs permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire antitumoral, hors contexte thérapeutique. Il a été démontré que les CSP sont capables de séquestrer les lymphocytes T CD8⁺ antitumoraux dans le MET. Dans cette configuration, les CSP empêchent les lymphocytes d'atteindre la tumeur, et contribuent ainsi à la survie tumorale par échappement au système immunitaire **[Ene-Obong et al. 2013]**.

3) Stimulation autocrine des cellules stellaires pancréatiques :

Bien que soumises aux signaux paracrines émis par les cellules cancéreuses, les CSP sont capables de soutenir leur propre activité et niveau d'activation *via* une signalisation autocrine (Figure 13). En accord avec ces propriétés autocrines, certains chercheurs considèrent que les CSP sont en mesure de maintenir leur niveau d'activation de façon permanente après une activation primaire par un facteur exogène [Bachem *et al.* 2006 ; Apte *et al.* 2012]. Cette théorie pourrait expliquer l'impact des inflammations chroniques (telles que les pancréatites chroniques) sur le développement et l'activation du stroma en amont de la stimulation induite par les cellules tumorales [Bachem *et al.* 2006 ; Apte *et al.* 2012].

Il a été démontré dans la littérature que les CSP sécrètent du TGF- β 1 et expriment le récepteur au TGF- β 1. En réponse à une stimulation autocrine au TGF- β 1, les CSP voient leur capacité de synthèse d'élément de la matrice augmenter et leur prolifération diminuer [Schneider *et al.* 2001 ; Shek *et al.* 2002 ; Bachem *et al.* 2006].

D'autres boucles de stimulation autocrine ont été identifiées sur les CSP, impliquant non seulement le TGF- β 1, mais également IL-1, IL-6 et la COX-2 (*via* ses métabolites inflammatoires type prostaglandine) (Figures 11 et 13). Les voies de signalisation activées en aval dépendant principalement de Smad3 et ERK1/2 [Kruse *et al.* 2000 ; Aoki *et al.* 2006a et 2006b et 2007], de l'activine A [Ohnishi *et al.* 2003] et du peptide endotheline-1 [Klonowski-Stumpe *et al.* 2003].

De la même manière, les espèces réactives oxydantes (ROS) provenant de cellules acinaires, ductales ou immunitaires subissant une inflammation, stimulent la sécrétion de ROS par les CSP, et génèrent une boucle de stimulation auto et paracrine [Apte *et al.* 2000 ; Masamune *et al.* 2008]. Les ROS stimulent et entretiennent un niveau élevé d'activation des CSP *via* leur activité NADPH oxydase. Il a été démontré qu'inhiber la NADPH induit une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une réduction de la sécrétion d'IL-1 et de Collagène type I. L'inhibition de la NADPH oxydase empêcherait également l'activation des CSP [Masamune *et al.* 2008].

VII) Hétérogénéité des CSP :

De plus en plus d'études se focalisent sur la diversité de phénotype au sein d'une population de CSP. Comme nous l'avons précédemment évoqué, il existe divers profils d'expression de l' α -SMA dans les CSP ainsi que dans les CAF. Le profil d'expression de l' α -SMA, associés à d'autres marqueurs est employé afin de caractériser les divers phénotypes de CAF **[Bussard et al. 2016]**.

Concernant les CSP, il a été démontré à la fois *in vitro* et *in situ* qu'il existe deux populations distinctes de CSP au sein des tumeurs d'ACP. Ces deux sous-types de CSP sont exprimés à des endroits différents du MET, le sous type dit « myofibroblastique » est localisé en périphérie de la tumeur et exprime fortement l' α -SMA, alors que le sous-type « sécrétoire » qui est caractérisé par une forte expression d'IL-10 et 6 mais exprime faiblement l' α -SMA, est présent dans les régions lointaines du MET **[Ohlund et al. 2017]**.

Plus récemment, une étude regroupant près de 14 unités de recherches internationales a démontré l'existence de 4 sous-types (ou phénotypes) de CSP différents (Figure 15) **[Neuzillet et al. 2019]**. Les phénotypes de CSP sont caractérisés par leur niveau d'expression de marqueurs spécifiques tels que l' α -SMA, la vimentine, leurs capacités prolifératives, de synthèse de MEC ou encore leur capacités à interagir avec les cellules cancéreuses **[Neuzillet et al. 2019]**.

Les résultats prennent également en compte la signature stromale développée par Moffitt et collaborateurs. Cette signature répertorie plus d'une quarantaine de gènes exprimés dans le stroma normal ou activé et permet de classer le stroma dans l'une ou l'autre des deux catégories en fonction du niveau d'expression de ces gènes **[Moffitt et al. 2010]**. Il a été démontré que les patients ayant une signature stromale « activée » ont une survie médiane de 15 mois contre 24 pour les patients présentant une signature de stroma « normale » **[Moffitt et al. 2010]**.

La mise en évidence de sous-types de CSP présentant des phénotypes différents montre qu'il existe une certaine hétérogénéité au sein du MET (Figure 15).

Il est à noter que la classification des sous-types de CSP montre qu'il existe un lien entre l'expression de α -SMA et la prolifération cellulaire : une forte expression de α -SMA est associée à de faibles capacités prolifératives [Neuzillet *et al.* 2019].

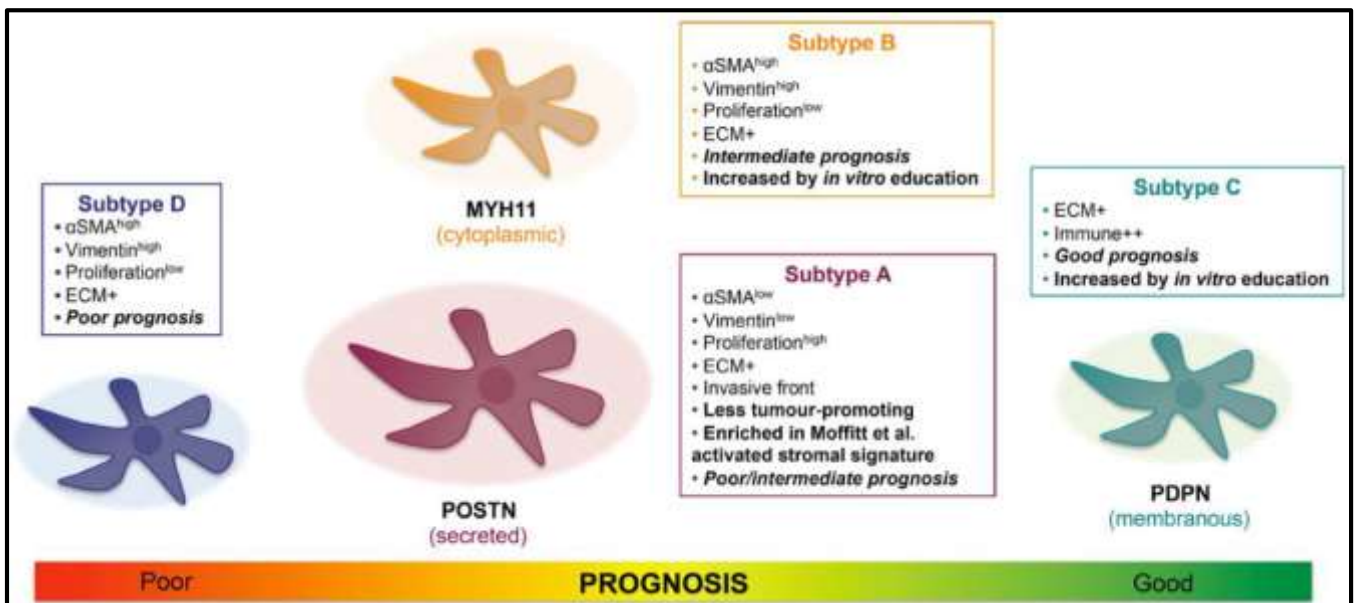


Figure 15) Hétérogénéité des CSP :

Le schéma représente les différents sous-types de CSP identifiés et caractérisés en fonction de marqueurs spécifiques. MYH11 : myosine-11 ; POSTN : périostine ; PDPN : podoplanine. Les différents phénotypes sont classés en fonction du pronostic qui leur est associé.

D'après [Neuzillet *et al.* 2019].

CHAPITRE 4) MECANISMES IONIQUES DE PROLIFERATION ET DE SURVIE CELLULAIRE :

I) La prolifération cellulaire :

La prolifération cellulaire et l'apoptose sont deux mécanismes indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire. Ces deux processus antagonistes dépendent de facteurs intracellulaires tel que l'intégrité de l'ADN, mais également d'origine exogène comme la disponibilité en facteurs de croissance **[Duronio et Xiong, 2013]**.

Une dérégulation de la balance prolifération / apoptose est la cause de pathologies graves tel que les maladies auto-immunes ou le cancer.

L'homéostasie ionique est un important régulateur de la prolifération et de l'apoptose cellulaire. Il a été démontré que les ions tels que le calcium, le potassium ou le chlore régulent ces processus. La régulation des concentrations de ces ions par les canaux ionique est indispensable à la signalisation mitotique, à la synthèse d'ADN et de protéines, ou encore à la variation du volume cellulaire au cours de l'apoptose **[Lang et al. 2005]**. La stimulation des cellules par des facteurs mitotiques influence également l'expression et la localisation membranaire des canaux ioniques et *in fine* la concentration ionique intracellulaire **[Lang et al. 2005 ; Zhou et al. 2019]**.

Il a été démontré que dans le cancer, pathologie présentant une dérégulation de la balance prolifération/apoptose, les canaux ioniques, régulent la prolifération cellulaire en favorisant la sécrétion de facteurs mitogène et la sensibilité des cellules cancéreuses à ces facteurs **[Prevarskaya et al. 2010]**. Les canaux ioniques influence également la résistance aux signaux anti-prolifératifs et pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses **[Prevarskaya et al. 2010]**.

Il existe un grand nombre de travaux portant sur le rôle du calcium, le second messenger universel, dans la prolifération et la survie cellulaire. Néanmoins, de plus en plus d'études investiguent le rôle du magnésium sur ces mécanismes.

Le magnésium et les canaux magnésiques sont indispensables à la prolifération et à la survie des cellules **[DeBaaje, 2015]**.

1) Le Cycle cellulaire :

La prolifération cellulaire est un mécanisme complexe impliquant de nombreuses étapes depuis la stimulation de la cellule mère par des facteurs mitogènes jusqu'à la création de cellules filles.

Le contrôle de la prolifération cellulaire s'effectue principalement pendant la première phase « d'intervalle » du cycle cellulaire, chez les eucaryotes, la phase G1 (Gap 1). Le contrôle du cycle durant la phase G1 est lié à divers voies de signalisations contrôlant la différenciation, la quiescence, la senescence ou encore la réponse cellulaire à une grande variété de stress. Il existe de très nombreux signaux permettant de réguler l'entrée des cellules en phase S, tel que la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur ou encore le système de contrôle de l'intégrité de l'ADN. L'entrée en phase S est un point de non-retour et, en l'absence de facteurs de stress tels que des lésions de l'ADN, les cellules progressent dans le cycle cellulaire dont la finalité est la division cellulaire. C'est pourquoi le phénomène de transition hautement contrôlé entre la phase G1 et la phase S est appelé « point de restriction ». Une fois le point de restriction passé les cellules deviennent moins réceptives aux signaux extracellulaires, complètent la phase de synthèse de l'ADN et s'engagent dans la seconde phase d'intervalle G2 (Gap 2) puis dans la phase de Mitose (phase M) **[Duronio et Xiong, 2013]**

Chez les mammifères, le point de restriction G1-S est contrôlé par la voie dite du « rétinoblastome », nommée ainsi suite à l'identification du premier oncogène : la protéine du rétinoblastome (pRB) **[Weinberg et al. 1990]** pRB appartient à une famille de protéines hautement conservées participant à la régulation du cycle cellulaire dans tous les organismes vivants. Chez les mammifères il existe 3 protéines appartenant à la famille RB : pRB1, p107 et p130 **[Weinberg et al. 1990 ; Van den Heuvel and Dyson 2008]** pRB est présent sous forme active hypophosphorylée dans les cellules quiescentes et possède des sites de liaisons hautement conservés avec les facteurs de transcription, principalement les membres de la famille E2F (Eucaryotic Elongation Factor). pRB régule négativement l'expression des gènes cibles de E2F, qui sont, pour la plupart indispensables au passage dans la phase S, et se lie également au facteur E2F pour bloquer sa translocation nucléaire ainsi que son activité de transactivation de gènes.

La phosphorylation de pRB par les CDK (Cyclin Dependent Kinase) durant la phase G1 induit la dissociation du complexe pRB-E2F, permettant la translocation nucléaire de E2F et la transcription des gènes cibles nécessaires à la transition G1-S. **[Dyson, 1998]**

La phosphorylation inhibitrice de pRB durant la phase G1 est l'œuvre de 3 CDK : les CDK 4 et 6 sont associées aux isoformes de la cycline D (D1,2 et 3) (Figure 16) **[Ewen et al. et Kato et al. 1993]**, et la CDK2 aux isoformes de la cycline E (E1 et E2) **[Akiyama et al. et Hinds et al. 1992]** Il a été démontré que les différentes combinaisons des isoformes de CDK/cyclines peuvent phosphoryler jusqu'à 16 sites sur la protéine pRB. **[Akiyama et al. 1992 ; Kitagawa et al. 1996]**. De multiples voies de signalisation et autres signaux régulateurs convergent vers cette étape de phosphorylation du complexe pRB-E2F par les CDK2,4 et 6. La perte de régulation au niveau du point de restriction engendre de nombreux troubles développementaux et pathologiques. La disparition du contrôle de la phase G1 représente d'ailleurs l'événement initiateur de nombreux cancers chez l'homme **[Sherr et al. 1996]**

Il existe de très nombreuses voies de régulations de la transition G1-S impliquant, entre autres, la régulation du niveau de l'expression des CDK, des Cyclines ou encore des CKI (inhibiteur de CDK), de leur localisation subcellulaire, ou encore de l'adressage de ces protéines au protéasome par Ubiquitinylation (Figures 16 et 17).

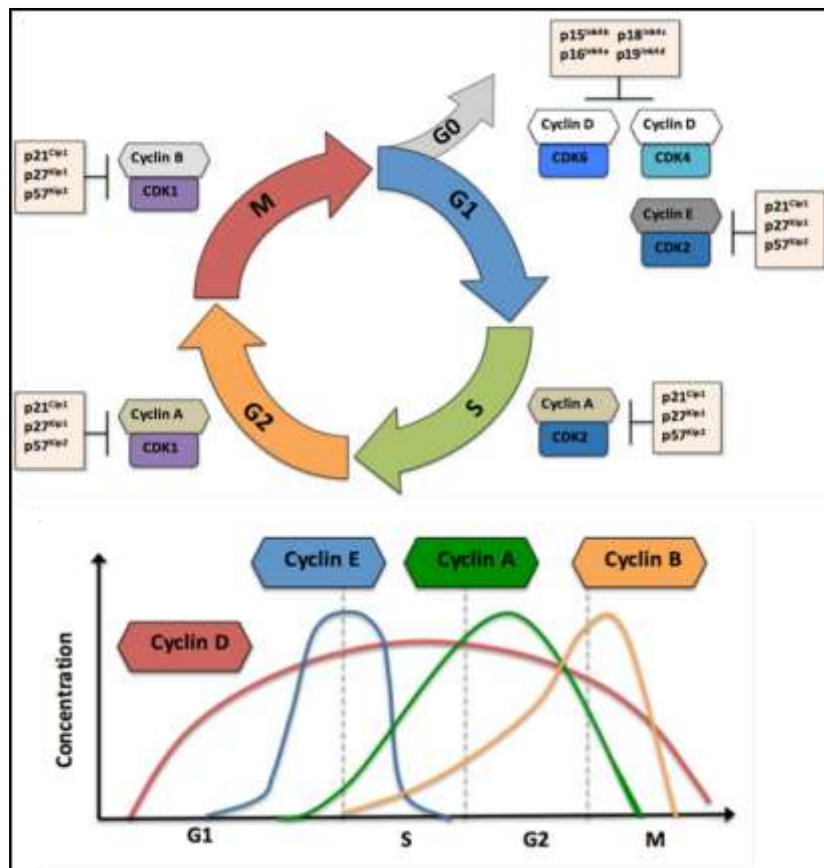


Figure 16) Cycle cellulaire et cinétique d'expression des cyclines :

La figure représente le cycle cellulaire en faisant apparaître les différentes Cyclines, CDK et CKI en face de la phase qu'elles régulent (ou du point de transition). La cinétique d'expression des cyclines au cours du cycle cellulaire est également représentée sur la figure.

D'après www.cubocube.com, chapitre « cell cycle ».

2) Rôle de la cycline E dans la transition G1-S :

La cycline E est régulée par deux gènes chez les mammifères (E1 et E2). Il a été démontré que son expression n'est pas indispensable au développement de l'organisme puisque des souris déficientes en cycline E1, E2 ou encore en CDK2 sont viables et ne présentent que des anomalies développementales tardives et mineures. **[Berthet et al. , Gengnet al. et Ortega et al. 2003]** . Ces résultats suggèrent qu'il existe un mécanisme de compensation par les autres CDK et cyclines. L'expression de la cycline E augmente durant la transition G1-S puis diminue pendant le reste du cycle cellulaire (Figure 16) **[Lew et al. 1991; Dulic et al.**

et Koff et al. 1992] Les cellules présentant une faibles expression des cyclines E prolifèrent plus lentement et répondent moins aux signaux mitotiques **[Herrera et al. 1996; Geng et al. 2003]**. A l'inverse dans le cas d'une sur-expression des isoformes de la cycline E, la phase G1 est plus courte, les cellules amorcent plus rapidement la transition vers la phase S et le niveau de phosphorylation de pRB est augmenté. **[Hinds et al. 1992; Ohtsubo and Roberts 1993; Resnitzky et al. 1994]**.

Parallèlement, il a été démontré *in vivo* qu'une surexpression de la Cycline E génère des tumeurs mammaires sur modèle murin génétiquement modifié. **[Smith et al. 2006]**. La surexpression de la cycline E est d'ailleurs fréquemment observée dans de nombreux cancers humains et elle est corrélée à l'agressivité de la tumeur **[Hwang and Clurman 2005]** Le contrôle du niveau d'expression de la cycline E est donc indispensable au maintien d'une prolifération cellulaire physiologique ainsi que pour la prévention du cancer.

3) Rôle de la CDK2 dans la transition G1-S :

En dépit du rôle central du complexe Cycline-E/ CDK2 dans la transition G1/S, il a été démontré que l'expression de CDK2 n'est pas indispensable à la progression dans le cycle cellulaire (Figure 17). En effet, des modèles murins KO pour CDK2 présentent simplement une phase S plus longue de 4h que les souris contrôles et demeurent viables **[Berthet et al. et Ortega et al. 2003]**.

Cet effet s'explique par l'existence de mécanismes de compensation de la transition G1/S impliquant CDK1 et CDK4. En effet, en absence de CDK2, il a été démontré que CDK1 ou CDK4 peuvent former des complexes avec la cycline E et permettre la progression en phase S **[Aleem et al. 2005 ; Jablonska et al. 2007]**. L'isoforme de CDK remplaçante dépend du modèle de cellule étudié, et certains types cellulaires ne présentent aucun mécanisme de compensation et présentent donc une prolifération strictement dépendante de l'expression de CDK2 **[Aleem et al. 2005 ; Jablonska et al. 2007]**.

4) Rôle des CKI dans la transition G1-S :

Les inhibiteurs de CDK ou CKI (CDK inhibitor) permettent de bloquer le cycle cellulaire à plusieurs endroits, principalement en phase G1, en réponse à un stress cellulaire, à l'absence de facteurs de croissances, à des mutations de l'ADN ou afin de permettre la différenciation cellulaire (Figure 16) [Malumbres *et al.* 2009]. Le rôle des CKI est indispensable à la limitation de la prolifération cellulaire, et un défaut d'expression des CKI conduit à une prolifération aberrante et à la formation de tumeurs. Il existe 2 grandes familles de CKI : la famille CDKN1 (Cyclin Dependent Kinase iNhibitor 1), comprenant p21, p27, et p57 ; et la famille INK4 (INhibitor of CDK4) comprenant p15, p16, p18, et p19 [Xiong *et al.* et Harper *et al.* 1993 ; Sherr *et al.* 1995]. Les inhibiteurs de la famille INK4 sont impliqués dans le contrôle de la transition G0/G1 alors que ceux de la famille CDKN1 interviennent dans les phases G1, S, G2 et M [Malumbres *et al.* 2009].

Les CKI, notamment p21 et p27, entrent en contact avec le complexe CDK/Cycline et se lient aux motifs présents sur les deux molécules afin d'empêcher la phosphorylation. Les CKI peuvent également induire l'ubiquitinylation du complexe CDK / Cycline et l'adresser au protéasome. (Figure 17)

Ces inhibiteurs sont actifs dans le noyau et une accumulation cytoplasmique de p21 et p27 est retrouvée dans le cancer, et associée à un mauvais pronostic [Wander *et al.* 2011]

5) Rôle de PCNA dans la transition G1-S :

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a initialement été identifiée comme un antigène exprimé dans le noyau des cellules en cours de réplication de l'ADN [Leonardi *et al.* 1992]. Il s'agit d'une protéine de type «DNA clamp sliding protein» (protéine glissant sur l'ADN) permettant la réparation et la réplication de l'ADN. PCNA permet entre autre la stabilisation de l'ADN polymérase δ et est indispensable au bon déroulement de la phase S [Moldovan *et al.* 2007]. Le gène codant pour PCNA est transactivé par E2F, et l'expression de PCNA influence la transition G1-S en interagissant avec des protéines du cycle comme la cycline D, p21, ou GADD45

(Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein) [Matsuoka *et al.* et Smith *et al.* 1994 ; Gulbis *et al.* 1996]. Lorsqu'il est exprimé, le CKI p21 forme un complexe avec PCNA et empêche son interaction avec l'ADN polymérase, Bloquant la transition G1-S [Flores-Rozas *et al.* 1994 ; Gulbis *et al.* 1996]. Néanmoins, la formation d'un complexe avec p21 n'inhibe pas la fonction de réparation de l'ADN de PCNA [Flores-Rozas *et al.* 1994]. En cas de lésions de l'ADN, P53 transactive le gène codant pour la protéine GADD45 (Groth Arrest and DNA Dammage), impliquée dans la réparation de l'ADN, qui empêche la formation d'homotrimère de PCNA et oriente la cellule vers la réparation de l'ADN, induisant un blocage en phase G1 du cycle cellulaire [Smith *et al.* 1994 ; Chen *et al.* 1995]. En l'absence d'activation de P53, PCNA permet la progression dans la phase S par la formation de trimères actifs et en interagissant avec la cycline D1 [Matsuoka *et al.* 1994 ; Moldovan *et al.* 2007].

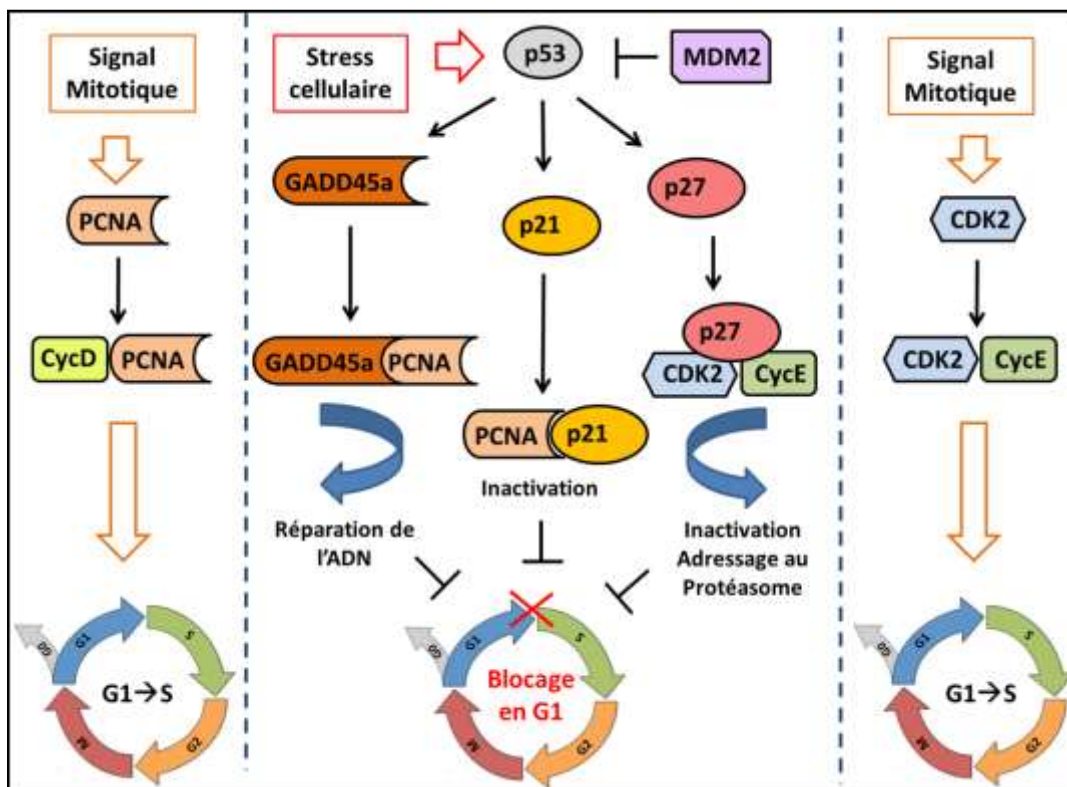


Figure 17) Régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire :

Le schéma représente l'implication des Cyclines, CDK, CKI, P53 et de PCNA dans la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. L'activation de p53 est représentée comme le principal élément régulateur de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Il est à noter que des anticorps contre PCNA sont utilisés pour déterminer les capacités répliquatives de cellules cancéreuses au même titre que le Ki-67 (antigène prolifératif). [Leonardi *et al.* 1992]. Cette protéine est fortement liée à la prolifération des cellules et indissociable de la phase S du cycle cellulaire.

6) Le facteur p53 : gardien du génome :

A) Généralités sur le facteur p53 :

P53 est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans la réponse des cellules au stress, dans l'apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence, le métabolisme, l'autophagie et l'arrêt du cycle cellulaire [Biegging et Attardi, 2012]. P53 est surnommée « le gardien du génome » [Levine *et al.* 1997], il oriente la cellule vers une réponse particulière en fonction de la nature et de l'intensité du stress subit.

La protéine p53 est codée par le gène *TP53*, localisé en 17p13.1, il s'agit du gène suppresseur de tumeur le plus important puisque 50% des cancers présentent des mutations inhibitrices de *TP53* [Hollstein *et al.* 1991 ; Vousden *et al.* 2007]. L'effet suppresseur de tumeur exercé par le facteur p53 est lié à sa capacité à orienter la cellule vers l'apoptose afin d'éviter la propagation des mutations. Il a été démontré que des souris déficientes en p53 développent d'avantage de tumeurs [Donehower, 1996].

La protéine p53 possède 2 domaines de transactivation permettant également son interaction avec la protéine régulatrice MDM-2 (Murine Double Minute 2), et un domaine de liaison à l'ADN, il s'agit par ailleurs de la région la plus souvent mutée dans le cancer. Un domaine de tétramérisation ainsi qu'une région en C-terminale de régulation de son interaction avec l'ADN sont également présents, en plus des séquences de localisation nucléaire et d'export cytoplasmique [Varna *et al.* 2011].

L'expression et l'activité de p53 sont régulées à plusieurs niveaux et permettent de maintenir p53 sous forme latente dans la cellule saine. En plus de régulations

transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles, p53 est pris en charge et régulé négativement par l'ubiquitine ligase MDM-2, empêchant son activité en condition physiologique [Moll et Petrenko 2003].

MDM-2 est le principal régulateur de p53, elle interagit au niveau du domaine de transactivation de p53 et induit son export vers le cytoplasme. En tant qu'ubiquitine ligase, elle favorise la dégradation de p53 par le protéasome 26S cytoplasmique, ou, par le protéasome nucléaire en cas de forte expression de MDM-2 [Chowdary *et al.* 1994 ; Shmueli et Oren 2004]. MDM-2 est également une cible transcriptionnelle de p53. Il existe donc un système d'autorégulation de l'activité de p53 et les deux protéines se régulent mutuellement [Freedman *et al.* 2014].

La phosphorylation du facteur p53 sur résidus sérines (Ser 15 / 20 / 33 / 37) par de nombreuses kinases (plus d'une vingtaine interagissent avec P53) diminue l'interaction de MDM-2 avec p53 et favorise son activité [Hupp *et al.* 1994].

A l'inverse, il a été démontré que la phosphorylation de MDM-2 favorise la fixation de p53 et sa dégradation par le protéasome (Figure 18) [Goldberg *et al.* 2002]. AKT et Sgk1 (Serum and glucocorticoides regulated kinase) comptent parmi les kinases connues pour phosphoryler MDM-2 sur résidu sérine 166/186 et favoriser son activation [Amato *et al.* 2009 ; Feng *et al.* 2012].

Il est possible d'inhiber l'interaction entre p53 et MDM-2 par l'utilisation de la nutline, cet analogue de *cis*-imidazoline se loge dans la poche de liaison au facteur p53 située sur MDM-2 (Figure 18). Parmi les analogues de la nutline, la nutline-3 est l'inhibiteur le plus utilisé en cancérologie et permet de réduire significativement la destruction de p53 [Vassilev *et al.* 2004].

B) Rôle de p53 dans la prolifération cellulaire :

Le facteur p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et permet la réparation de l'ADN en cas de lésions légères, alors que dans le cas de lésions importantes empêchant la réparation, la cellule est orientée vers l'apoptose (Figure 18).

p53 interagit de façon directe avec les systèmes de réparation de l'ADN tels que BRCA1, l'ADN polymérase β , l'endonucléase APE1 (Apurinic Apyrimidic

Endonuclease type 1), ou encore l'hélicase XPB (*xeroderma pigmentosum* type B) [Zhou *et al.* 2001, Sengupta et Harris 2005 ; Gatz et Wiesmuller 2006].

Le facteur p53 exerce un effet antiprolifératif *via* le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la phase G1 (Figure 17) afin d'éviter la synthèse de l'ADN muté et la réplication des mutations, mais également au cours de la phase G2 afin d'empêcher l'entrée en mitose si l'ADN est mal répliqué [Teyssier *et al.* 1999]. L'arrêt au niveau de ce point de restriction se fait *via* l'interaction directe de p53 avec des acteurs de la réplication [Dutta *et al.* 1993] ou par la régulation de p21 (Figure 17). P21 est une des cibles de p53 et inhibe l'interaction cycline E / CDK2 et cycline D / CDK4 (Figure 17) [ElDeiry *et al.* 1994]. p53 permet également l'arrêt en phase G2/M principalement en inhibant l'expression de la cycline B et de CDK1 [Innocente *et al.* 1999].

7) Voies de signalisations mitotiques :

La progression du cycle cellulaire dépend de la perception par la cellule de signaux mitotiques d'origine exogènes en particulier la fixation de facteurs de croissance sur les RTK (Récepteur Tyrosine-Kinase) correspondant qui génère une réponse mitotique par l'intermédiaire de voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT.

La PI3K (Phosphoinositide-3-kinase) est une kinase composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110 ayant pour substrats les phosphatidyl inositols (4,5) biphosphates (PIP₂) membranaires et générant la formation de PIP₃ (phosphatidyl inositols (3,4,5) triphosphates) (Figure 18). La PI3K est activée principalement par des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et par la protéine Ras (GTPase) également impliquée dans l'activation de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) [Zhao *et al.* 2008]. La stimulation d'un RTK par un facteur de croissance engendre le recrutement de la sous unité p85 de PI3K influençant directement la phosphorylation des PIP₂ par p110. La production de PIP₃ induite par l'activation de PI3K permet le recrutement et l'activation de la kinase membranaire AKT impliquée dans la signalisation de la prolifération, de la survie, de l'adhésion et de la migration cellulaire [Vanhaesebroeck et Waterfield 1999 ; Cantley *et al.* 2002 ; Engelman *et al.* 2006]. AKT est une sérine/thréonine kinase

possédant de nombreuses cibles tel que GSK3- β , MDM-2 ou encore mTOR (mammalian Target of Rapamycin). La phosphorylation des cibles d'AKT permet la régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire (Figure 18) [Carnero et Paramio 2014].

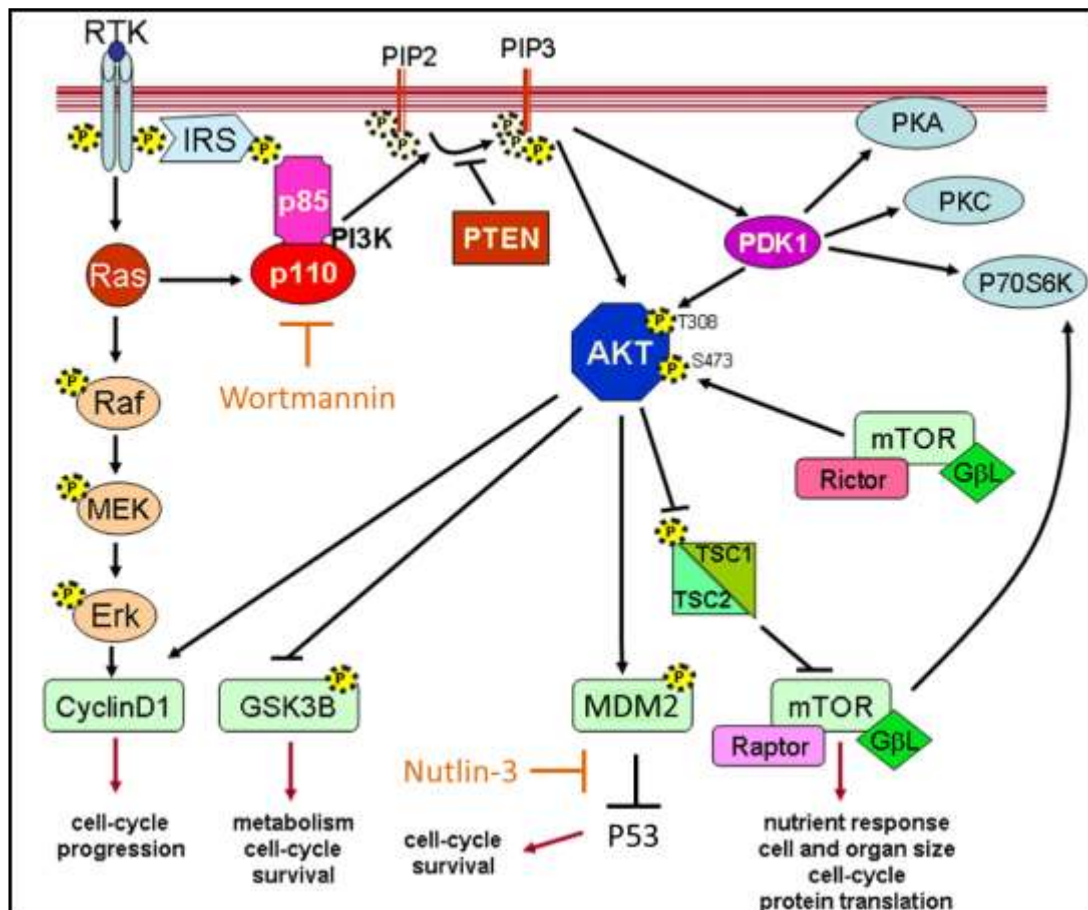


Figure 18) Voie PI3K/AKT et rôle d'AKT dans la survie et la prolifération cellulaire :

Le schéma présente l'activation de la PI3K par un RTK *via* la protéine Ras. La kinase AKT est représentée en position centrale avec ces principales cibles mitotiques, ainsi que des éléments régulateurs situés en amont. La wortmannine, inhibiteur de PI3K, ainsi que la Nutlin-3, inhibiteur de la dégradation de p53 sont également représentés.

Modifié d'après [Carnero et Paramio 2014].

A) La protéine GSK3 :

La protéine GSK3 (Glycogene Synthase Kinase 3) est une sérine / thréonine kinase impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 19). Elle est exprimée sous deux isoformes (α et β) et intervient dans la réponse au stress, la survie, la prolifération cellulaire et la régulation du métabolisme [Ali *et al.* 2001 ; Maurer *et al.* 2006 et 2014].

Contrairement à la plupart des protéines activées par phosphorylation, GSK3 est régulée par phosphorylation inhibitrice. En effet, l'activité enzymatique de GSK3 dépend de la liaison du substrat au niveau d'une poche de fixation permettant une première phosphorylation du substrat. Les kinases inhibant GSK3 phosphoryle les résidus sérines présents au niveau de la poche de fixation du substrat [TerHaar *et al.* 2001]. L'inactivation de GSK3- α est effectuée par ajout d'un groupement phosphate sur le résidu sérine 21 ou bien sérine 9 pour GSK3- β (Figure 19) [Maurer *et al.* 2014].

Les deux isoformes de GSK3 se comptent parmi les cibles de la kinase AKT et sont également régulées par d'autres voies de signalisation comme Wnt. La stimulation de la voie PI3K/AKT par des facteurs de croissance induit la phosphorylation et l'inactivation de GSK3 [Frame *et al.* 2001].

En absence de facteur de croissance ou de nutriment dans le milieu extracellulaire GSK3 n'est pas phosphorylée et son activation permet d'inhiber la prolifération cellulaire et favorise l'apoptose, constituant une réponse adaptative de la cellule au stress. L'effet inhibiteur induit par GSK3 non phosphorylée sur la prolifération cellulaire passent par la régulation négative de nombreuses cibles. Parmi les principales cibles de GSK3 Impliquées dans la prolifération ont compte la β -catenin, le facteur c-Myc, et les cyclines D et E dont elle régule l'adressage au protéasome (Figure 19). [Yang *et al.* 2006 ; Fujimura *et al.* 2015 ; Kazi *et al.* 2018].

GSK-3 favorise également l'apoptose cellulaire en interagissant avec le facteur P53 et en exerçant une répression des facteurs impliqués dans la survie cellulaire tels que le facteur CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) ou la protéine anti-apoptotique Mcl-1 [Grimes *et al.* 2001 ; Watcharasit *et al.* 2002 ; Koo *et al.* 2015].

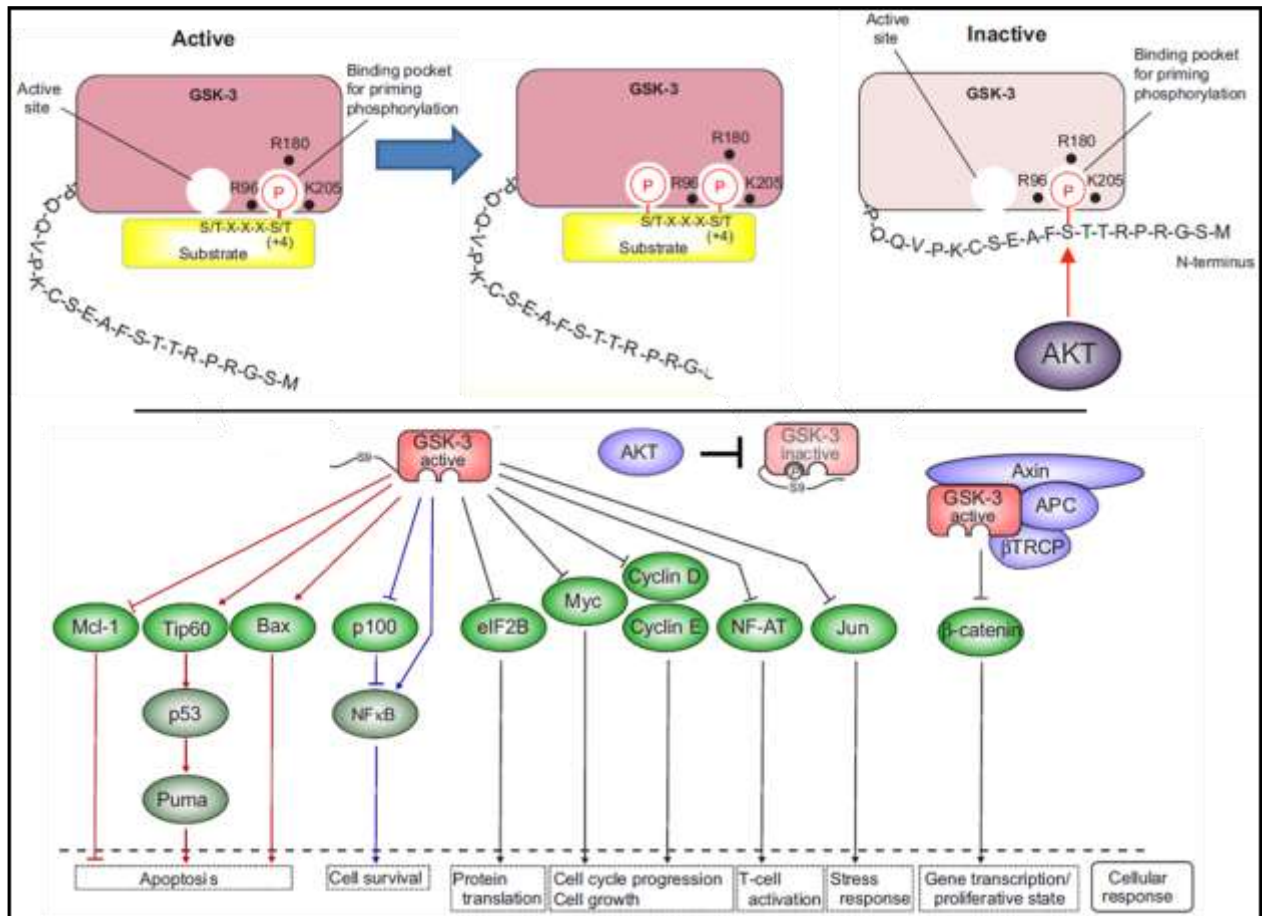


Figure 19) Régulation, catalyse enzymatique et cibles de GSK3 :

La figure représente le mode d'action de GSK3 (ici l'isoforme β) impliquant la reconnaissance et la phosphorylation primaire du substrat au niveau d'une poche dans la structure de la kinase. La phosphorylation sur résidu sérine 9 de la partie N-terminale inhibe l'activité kinase. Le schéma représente également les cibles de GSK3 et les processus cellulaires qu'elle régule.

Modifié d'après [Maurer *et al.* 2014].

II) Survie cellulaire :

1) La mort cellulaire :

La mort cellulaire est un processus naturel et indispensable au mécanisme d'homéostasie tissulaire et *in fine* au bon fonctionnement de l'organisme. Il existe 3 grand types de mort cellulaire : la mort cellulaire programmée de type I ou apoptose,

la mort cellulaire programmé de type II ou phagocytose, et la mort cellulaire accidentelle (type III) ou nécrose **[Shakeri et al. 2018]**. Il existe également d'autres mécanismes de mort cellulaires plus rares, et découverts plus récemment comme la ferroptose, la nécroptose, ou la mort par perte de contact cellulaire : l'anoikis **[Ashrafizadeh et al. 2019]**. L'orientation de la cellule vers un type particulier de mort cellulaire dépend de nombreux paramètres. Les conséquences produites sur la cellule et son environnement sont variables en fonction du type de mortalité induite. Il a notamment été démontré que la destinée de la cellule dépend grandement de la gravité des lésions subies par l'ADN ou encore de ses réserves énergétiques en ATP. Ainsi, en cas de lésions de faible intensité et réparable, la cellule est orientée vers la survie, alors qu'en cas de lésions plus grave, elle est orientée vers la mort. La mort cellulaire programmée est un processus qui nécessite de l'énergie, aussi, une cellule ayant de faibles quantités d'ATP sera orientée vers la nécrose **[Tsuji moto, 1997]**.

2) L'Apoptose :

L'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire programmée le plus connu à l'heure actuelle. En condition physiologique, l'apoptose permet d'éliminer les cellules mutées, endommagées ou inutiles, et intervient pendant le développement embryonnaire et à tout moment de la vie d'un individu **[Green et Reed, 1998]**.

Il s'agit d'un processus génétiquement programmé qui se déroule de façon très ordonné **[Kerr et al. 1972]**. Il existe des signes précoces de mise en place du processus apoptotique. Dans les premières phases de l'apoptose la membrane plasmique change de conformation et les bicouches lipidiques sont échangées. Ainsi, le feuillet lipidique originellement en position cytosolique se retrouve en contact avec le milieu extracellulaire et *vice versa*. **[Zwaal et al. 1997 ; Chap et al. 1977]**

Dans le cadre du processus apoptotique on observe également une diminution importante du volume cellulaire liée à la condensation du cytoplasme. Le noyau est également condensé de même que la chromatine qu'il contient, et des mécanismes de clivages de l'ADN par les caspases sont mis en places. **[Wyllie et al. 1984]**

D'autres organites voient leur fonctionnement perturbé, le potentiel membranaire mitochondriale chute et la mitochondrie devient perméable, notamment au cytochrome c, qui permet l'activation des caspases lorsqu'il est dans le cytoplasme (Figure 20) [Marchetti *et al.* et Zamzami *et al.* 1996 ; Vander Heiden *et al.* , Kluck *et al.* et Yang *et al.* 1997].

Dans les phases apoptotiques tardives il y a également apparition de corps apoptotiques formés par bourgeonnements membranaires. L'apoptose est un processus finement régulé et activé par de nombreux signaux physiologiques bien qu'il existe également des déclencheurs pathologiques.

A) Voies apoptotiques :

L'apoptose peut être induite par deux voies différentes, une voie dit intrinsèque, impliquant des causes endogènes (mutations, ROS, stress divers), ainsi qu'une voie extrinsèque liée à la communication intercellulaire via des récepteurs de mort (Figure 20) [Green *et Reed* 1998 ; Fulda *et Debatin* 2006]. Le processus apoptotique, indépendamment de l'origine du facteur initiateur, implique une famille d'enzymes : les caspases, divisées en deux catégories, les caspases initiatrices (2, 8 et 9) et les effectrices (3, 6 et 7). La perception du signal apoptotique induit l'activation des caspases initiatrices, sous forme de pro-caspase à l'état latent, permettant l'activation des caspases effectrices alors sous forme inactive et activée par clivage. Les caspases effectrices ainsi activées vont cliver de nombreux substrats tel que PARP (Poly-ADP-Ribose Polymérase), Bcl-2, des inhibiteurs de caspases, ou encore des régulateurs du cycle comme p21, p27 ou Rb, ainsi que des acteurs de la signalisation cellulaire comme AKT [Boise *et al.* 1995 ; Widmann *et al.* 1998; Jin *et al.* 2000 ; Soldani *et al.* 2002 ; Liston *et al.* 2003] Le substrat clivé par la caspase effectrice est inactivé, la perte de l'activité biologique des substrats aboutit à la mort cellulaire.

a) Voie apoptotique intrinsèque :

L'apoptose par voie intrinsèque implique directement la mitochondrie, et les différents signaux apoptotiques issus d'un stress cellulaire aboutissent à la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale (Figure 20).

Les acteurs de la perméabilisation mitochondriale appartiennent à une famille de protéine caractérisée par l'expression de domaine BH (Bcl-2 Homology). Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xl expriment 4 domaines BH (1 à 4) alors que les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bid ou Bad n'expriment que les domaines 1, 2 et 3 ou uniquement le domaine BH3. L'apoptose est un processus qui dépend du ratio d'expression des protéines pro et anti-apoptotiques [**Jin et al. 2005**]. Les facteurs pro-apoptotiques tel que Bax permettent la création de pore sur la membrane mitochondriale en formant des dimères. Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 peuvent s'associer à Bax via leurs domaine BH4 afin d'empêcher la dimérisation de Bax. Une forte expression de Bcl-2 exerce un effet protecteur sur l'apoptose alors qu'une expression importante de Bax favorise le processus apoptotique (Figure 20) [**Crompton et al. 2000 ; Wei et al. 2001**].

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie génère une chute du potentiel mitochondrial aboutissant au relargage de protéines initialement localisées dans l'espace inter-membranaire vers le cytosol [**Paolo et al. 2008**]. L'ouverture du pore à la surface mitochondriale permet notamment la sortie des protéines Smac et Diablo, du cytochrome c, de la pro-caspase 9, de l'AIF (Apoptosis Inducing Factor), et de l'endonucléase G [**Verhagen et al. 2000 ; Ferri et al. , Joza et al. et Parrish et al. 2001**]. Le cytochrome c interagit avec la pro-caspase 9 et l'APAF-1 (Apoptosis Proteine Activating Factor 1) afin de former l'apoptosome. Ce complexe multiprotéique permet le clivage de la pro-caspase 9 et la formation de caspase 9 active, permettant l'activation des caspases effectrices. Parallèlement à la formation de l'apoptosome, les protéines Smac et Diablo forment des complexes avec les inhibiteurs de l'apoptose IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) et les inactives [**Adrain et al. 2001 ; Saelens et al. 2004**]. L'endonucléase G et l'AIF sont, quant à eux, respectivement impliquées dans la dégradation de l'ADN, la condensation ainsi que la fragmentation de la chromatine [**Ravagnan et al. 2002**].

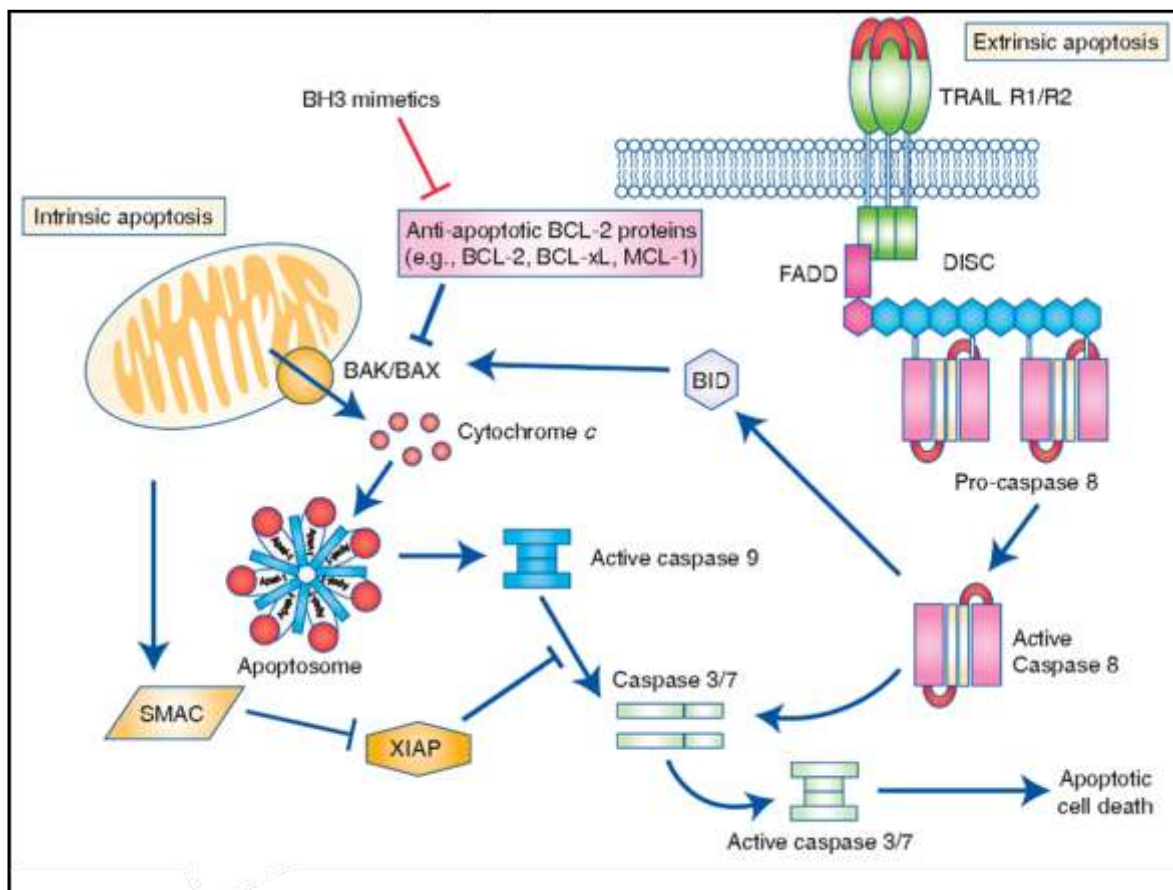


Figure 20) Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose cellulaire :

Le schéma représente les voies extrinsèques et intrinsèque de l'apoptose cellulaire. Un dimère de protéines BH3 est représenté sur la mitochondrie et matérialise le pore mitochondriale. La protéine « BH3 only » BID constitue un lien entre les deux types d'apoptose.

Modifié d'après [Fox *et al.* 2016]

b) Voie apoptotique intrinsèque :

La voie extrinsèque quant à elle implique l'activation de la voie de signalisation des récepteurs de mort, suite à leur activation par divers ligands (Figure 20). Il existe 3 types de récepteurs de mort : les récepteur TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), liés par les facteurs de mort solubles tels que le TNF, ou les récepteurs Fas et TRAILR (CD-95) se liant respectivement au Fas-L et au TRAIL (TNFR Related Apoptosis Inducing Ligand), des protéines situées sur la membrane d'autres cellules (principalement des cellules immunitaires). La fixation des ligands aboutit à

l'oligomérisation des récepteurs permettant l'activation de la caspase 8 initiateur clivant les caspases effectrices de l'apoptose extrinsèque [Medema *et al.* 1997]. La caspase 8 peut également cliver le facteur Bid (BH3 only), qui, sous sa forme active, t-Bid, induit la perméabilisation mitochondriale (Figure 20). Le clivage de t-Bid par la caspase 8 permet donc également l'activation de la voie apoptotique intrinsèque [Li *et al.* 1998].

B) Rôle de p53 dans l'apoptose cellulaire :

Comme nous l'avons vu, le facteur p53 est considéré comme le gardien du génome. Il permet à la fois d'induire l'arrêt de la prolifération cellulaire mais peut également orienter les cellules vers l'apoptose. L'hypostimulation de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire telle que PI3K/AKT en absence de nutriment ou de facteurs de croissance, l'hypoxie, ainsi que des lésions importantes de l'ADN peuvent induire l'apoptose via p53.

Le facteur p53 est impliqué dans l'apoptose cellulaire en permettant la transactivation des gènes codant pour les protéines apoptotiques telles que Bad, Bid, Noxa, Puma et APAF-1 et également la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [Miyashita *et al.* 1994 ; Oda *et al.* 2000 ; Nakano *et al.* et Moroni *et al.* 2001 ; Sax *et al.* 2002]. P53 influence également l'apoptose indépendamment de son activité de facteur de transcription en formant un complexe avec Bcl-2 ce qui permet l'association de dimères de Bax, perméabilisant la membrane mitochondriale externe [Mihara *et al.* 2003].

III) Magnésium et biologie cellulaire :

Le magnésium est le cation divalent le plus abondant dans les cellules. Il est indispensable à de nombreux processus physiologiques, non seulement en tant que co-facteurs enzymatiques mais également en régulant l'activité de nombreux seconds messagers, ainsi que le cycle cellulaire et la synthèse protéique. Le magnésium est également indispensable à l'acquisition et au maintien de la conformation spatiale de nombreuses macromolécules. D'un point de vue électrophysiologie, il permet de compenser la charge cellulaire et régule l'activité de nombreux canaux ioniques et transporteurs. **[Romani et al. 1992].**

Le magnésium régule également la concentration calcique et le pH intracellulaires et les mécanismes de sécrétion, prolifération, motilité, et contraction qui en découlent. Il est également un régulateur de la relaxation des cellules musculaires lisses, et joue de nombreux rôles dans le système vasculaire via le contrôle de la dilatation des vaisseaux périphériques et en exerçant des effets anti arythmiques. **[DeBaaij et al. 2015].**

Il a été démontré que de nombreuses pathologies telles que l'arythmie cardiaque, le diabète, l'alcoolisme chronique, ainsi que le cancer sont associées à une diminution de la concentration magnésique plasmatique.

Le magnésium permet de réguler le système immunitaire et un déficit magnésique engendre un syndrome inflammatoire avec une hyper-activation des cellules immunitaires. **[DeBaaij et al. 2015].**

1) Distribution cellulaire du magnésium :

La concentration totale de magnésium cytoplasmique est estimée entre 17 et 20mM, avec des concentrations similaires dans la mitochondrie, le noyau ainsi que dans le RE/RS. La concentration de magnésium libre dans les différents compartiments cellulaires ne représente que 5% du magnésium totale. Ceci s'explique par la complexation du magnésium avec de nombreuses molécules telles que les

phospholipides, les acides nucléiques, et de nombreuses protéines. En considérant l'existence de ces nombreux systèmes tampon, dont le plus important est l'ATP (MgATP), la concentration magnésique libre cytosolique est estimée entre 0,8 et 1,2 mM **[Ebel et Gunther, 1980 ; DeBaaje, 2015]**

L'ATP se fixe au magnésium avec un Kd d'environ 78 mM et constitue le système tampon majoritaire du magnésium dans la cellule. Le magnésium libre est également tamponné par la calmoduline, la troponine C et la parvalbumine ainsi que d'autres protéines possédant des sites de fixation du magnésium **[DeBaaje, 2015]**. De même, les phospholipides membranaires représentent un système tampon important, et permettraient la rétention et le relargage du magnésium au niveau de microdomaines membranaires **[Rubin et al. 2005]**.

La concentration extracellulaire du magnésium est, quant à elle, comprise entre 1,2 et 1,4 mM, majoritairement lié aux protéines matricielles. A la différence des autres cations, notamment le calcium et le sodium il n'existe pas de gradient chimique pour le magnésium. En l'absence de gradient de concentration entre les compartiments extra- et intracellulaires, la diffusion du magnésium à travers la membrane plasmique est faible en condition physiologique.

2) Les transporteurs magnésiques :

Il existe assez peu de protéines identifiées en tant que transporteurs ou canaux magnésiques. Certaines d'entre elles sont très peu connues comme les protéines CNNM (Member of the cyclin M family), d'autres sont d'avantage étudiées comme le canal TRPM7, TRPM6 ou encore MagT1 (Tableau 3 et Figure 21).

Tableau 3) Les principaux transporteurs magnésiques et leurs caractéristiques :

Nom	Localisation	Expression	Perméabilité	Mécanisme	Référence
TRPM7	Membrane plasmique	Ubiquitaire	Ba>Ni>Mg>Ca	Canal	<i>Nadler et al. 2001</i> <i>Runnels et al. 2001</i>
MagT1	Membrane plasmique	Ubiquitaire	Mg>Ba>Fe=Cu	Transporteur ?	<i>Goytain et al. 2005a</i> <i>Li et al. 2011</i>
SLC41A1	Membrane plasmique	Ubiquitaire	Mg>Sr>Fe>Ba>Cu	Echangeur	<i>Goytain et al. 2005b</i> <i>Hurd et al. 2013</i> <i>Kolisek et al. 2012</i>
SLC41A2	Membrane plasmique	Ubiquitaire	Mg>Ba>Ni>Ca	Echangeur	<i>Sahni et al. 2007</i>
CNNM3	Membrane plasmique	Ubiquitaire	Mg>Fe>Cu>Co	Transporteur ?	<i>Wang et al. 2003</i>
MRS2	Membrane Mitochondriale	Ubiquitaire	Mg>Ni	Canal	<i>Piskacek et al. 2009</i>
TRPM6	Membrane plasmique Apicale	Reins et intestins	Ba>Ni>Mg>Ca	Canal	<i>Li et al. 2006</i>
CNNM1	Inconnue	Cerveau	Cu>Mg ?	Inconnu	<i>Alderton et al. 2007</i> <i>Wang et al. 2003</i>
CNNM2	Membrane plasmique Basolatérale	Reins	Mg>Sr>Zn>Cd	Transporteur ?	<i>Goytain et al. 2005c</i> <i>Stuiver et al. 2011</i>
CNNM4	Membrane plasmique Basolatérale	Intestins	Mg	Echangeur ?	<i>Parry et al. 2009</i> <i>Yamazaki et al. 2013</i>

A) Le transporteur MagT1 :

Le transporteur MagT1 (Magnesium Transporteur 1) a pour la première fois été décrit et caractérisé en 2005 sur cellules murines et ovocytes de *xenopus* (Tableau 3 et Figure 21). **[Goytain et al. 2005a]**. Le canal permet la mise en place de courants magnésique hautement spécifique dans les ovocytes de xenopes, il est d'ailleurs indispensable au développement embryonnaire sur ce modèle **[Goytain et al. 2005a]**

Néanmoins, le courant magnésique dépendant de MagT1 n'a jamais été enregistré sur cellule de mammifère, et l'ovocyte de *xenopus* reste le seul modèle de caractérisation électrophysiologique du transporteur **[Goytain et al. 2005a ; Zhou et al. 2009]**.

Néanmoins il semblerait que MagT1 joue un rôle important dans certains types cellulaires. C'est notamment le cas dans les lymphocytes T, où il a été montré que MagT1 permet un rapide influx magnésique suite à l'activation de récepteurs membranaires **[Chaigne-Delalande et al. 2013 ; Li et al. 2011]**. De plus, bien que le canal TRPM7 soit indispensable à la thymopoïèse, la délétion de celui-ci n'influence pas la concentration magnésique intracellulaire des lymphocytes T, suggérant un mécanisme de compensation par un autre canal **[Jin et al. 2008]**. Il a également été démontré que la surexpression du transporteur MagT1 permet de recouvrir partiellement la survie et la prolifération cellulaire de cellules DT-40 TRPM7^{-/-} **[Deason-Towne et al. 2011]**. Dans ce modèle de cellule B, la prolifération cellulaire diminue de façon importante lorsque TRPM7 est invalidé et une compensation magnésique permet de restaurer la prolifération, suggérant que le transporteur MagT1 puisse être impliqué dans la restauration de la prolifération cellulaire **[Schmitz et al. 2003]**.

Ces résultats suggèrent que le canal MagT1 puisse agir comme un « remplaçant » de TRPM7 dans certaines conditions. Il est possible que les deux canaux exercent des fonctions similaires, mais les données concernant MagT1 restent plus rares.

Le canal semble également participer aux mécanismes de compensation en condition hypomagnésémie. En effet, son expression augmente de façon importante

dans les cellules épithéliales rénales cultivées dans un milieu pauvre en magnésium comparées aux cellules cultivées dans un milieu de culture classique [Goytain et al. 2005a]. Le niveau d'expression de MagT1 augmente également *in vivo* dans les cellules rénales murines lorsque les souris sont soumises à un régime pauvre en magnésium [Goytain et al. 2005a].

Il existe une controverse concernant l'identité protéique de MagT1. En effet, MagT1 a été identifié comme un constituant du complexe oligosaccharyltransferase (OST) et plus particulièrement du complexe STT3B. En effet, il a été démontré que le transporteur est muté chez les patients atteints de troubles congénitaux de la glycosylation. La délétion de MagT1 empêche la formation du complexe STT3B et défavorise directement le processus de glycosylation [Blonmaert et al. 2019].

Cette étude récente remet en question le rôle de MagT1 en tant que transporteur magnésique « seul » et suggère qu'il puisse influencer le fonctionnement cellulaire *via* son implication dans le complexe STT3B.

B) Le canal MRS2 :

Le canal MRS2 (Mitochondrial RNAsplicing 2) est le principal canal magnésique mitochondrial (Figure 21 et Tableau 3) [Zsurka et al. 2001]. L'inactivation de MRS2 aboutit à une diminution de l'entrée magnésique dans la mitochondrie et induit la mort cellulaire [Piskacek et al. 2009]. Le canal MRS2 régule la concentration magnésique intramitochondriale [Shindo et al. 2011] et permet à la mitochondrie de constituer une réserve intracellulaire de magnésium [Shindo et al. 2011]. Enfin MRS2 est un régulateur potentiel du cycle de la glycolyse *via* la régulation de la concentration mitochondriale en magnésium libre et Mg-ATP [Shindo et al. 2011].

C) L'échangeur SLC4A1 :

L'échangeur SLC4A1 (Solute Carrier Family 41 member 1) comprend 11 domaines transmembranaires et agit comme échangeur $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ avec une stoechiométrie de 2 : 1 [Goytain et al. 2005b]. Localisé à la membrane plasmique (Figure 21 et Tableau 3), il est la principale responsable de l'extrusion magnésique sodium dépendante dans la cellule [Hurd et al. 2013 ; Kolisek et al. 2013 ; Yan et al. 2011]. Les autres

membres de la famille SLC41 tel que SLC41A2 et A3 sont moins étudiés. Il a néanmoins été démontré que SLC41A2 régule l'influx magnésique dans les cellules DT-40 TRPM7^{-/-} [Sahni *et al.* 2007].

D) Le canal TRPM6 :

Le canal cationique TRPM6 est exprimé uniquement dans les cellules rénales et entérocytaire (Tableau 3) [Schlingmann *et al.* 2002 ; Groenestege *et al.* 2006 ; Lameris *et al.* 2013]. Il est situé sur la face luminale des entérocytes du cecum et du colon et permet la réabsorption du magnésium alimentaire. L'expression rénale de TRPM6 est cantonnée au tubule distal où le canal est le principal acteur de la réabsorption magnésique [Hoenderop *et al.* 2005 ; Hoenderop *et al.* 2008]. Le canal TRPM6 possède 6 segments transmembranaires et un pore situé entre les 5^{ème} et 6^{ème} segments, il est fonctionnel exclusivement sous forme d'hétérotétramères avec son homologue TRPM7 [Li *et al.* 2006 ; Zhang *et al.* 2014].

L'expression, la localisation membranaire et l'activité du canal TRPM6 sont régulées par plusieurs mécanismes [Cao *et al.* 2008]. L'activité du canal TRPM6 est régulée par la concentration de magnésium intracellulaire libre, qui exerce un effet inhibiteur sur le canal et permet de réguler l'absorption de magnésium [Voets *et al.* 2004]. Il a également été démontré que l'insertion membranaire de TRPM6 est facilitée par l'EGF et l'insuline via l'activation de la voie PI3K-Akt-Rac1 [Nair *et al.* 2012 ; Thebault *et al.* 2009]. L'insuline et l'EGF régulent également l'activité du canal TRPM6. Il a été démontré que les patients présentant une activité faible des récepteurs à l'EGF et à l'insuline sont plus susceptibles de subir une hypomagnésémie [Nair *et al.* 2012 ; Schrag *et al.* 2005]. Il existe d'autres modulateurs de l'activité de TRPM6 et *in fine* de l'absorption magnésique tel que le pH, la consommation magnésique, ou encore la concentration d'ATP [Thebault *et al.* 2008].

Comme cela a été évoqué il existe une grande homologie de séquence entre les canaux TRPM6 et TRPM7. Le canal TRPM7 est également un acteur clé de la régulation de l'homéostasie magnésique mais également calcique et du zinc [Mittermeier *et al.* 2019]. Néanmoins les caractéristiques de ce canal seront développées dans le chapitre lui étant dédié.

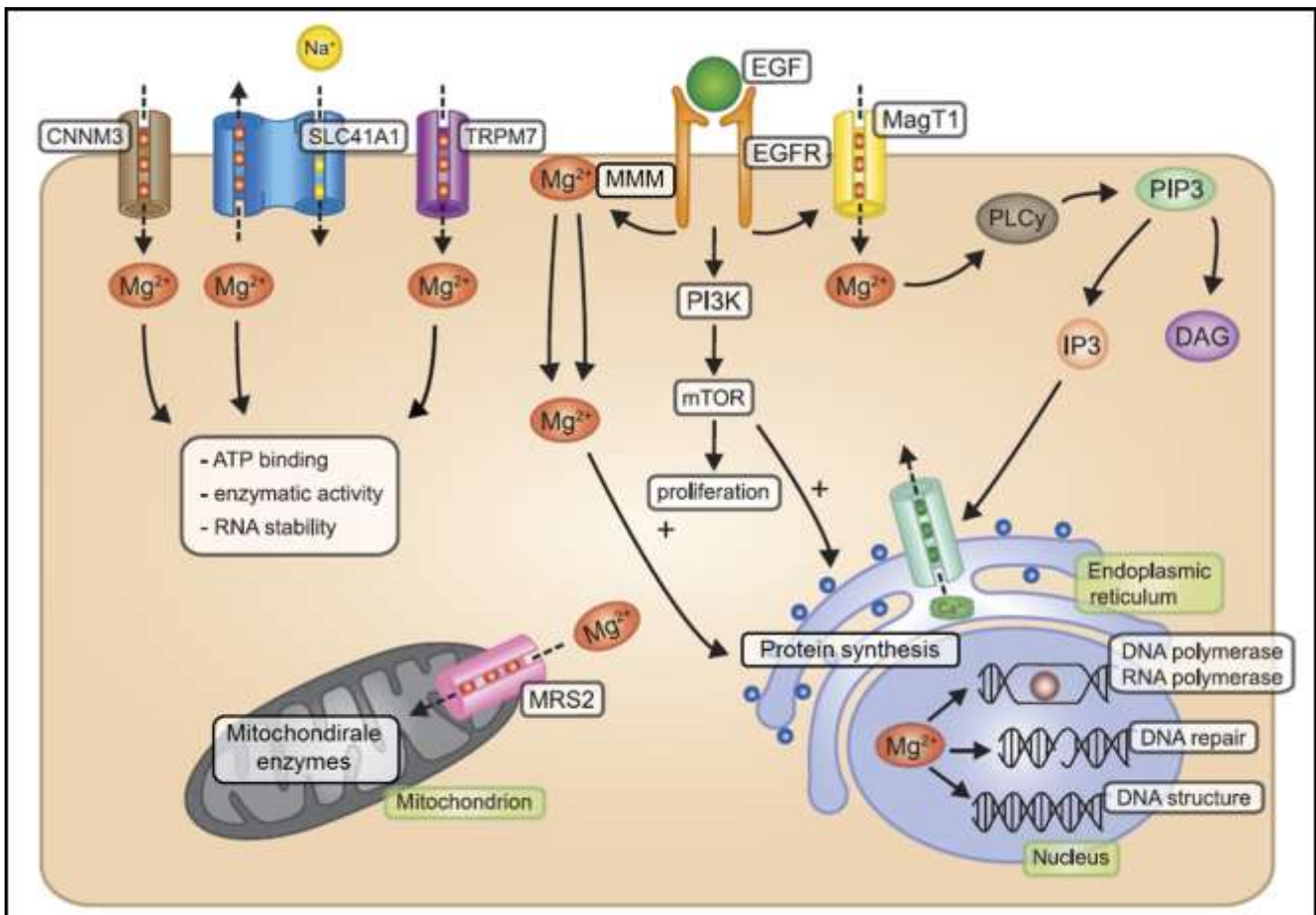


Figure 21) Magnésium et transporteurs magnésique dans la cellule :

Le schéma représente les principaux transporteurs, échangeurs et canaux magnésiques connus à ce jour, ainsi que le rôle du magnésium dans les différents compartiments cellulaires. Le schéma fait également apparaître le modèle « MMM » correspondant au relargage du magnésium chélaté par les phospholipides en réponse à la stimulation de la cellule par un facteur de croissance.

Modifié d'après [DeBaaje *et al.* 2015].

E) Autres transporteurs magnésiques :

En dehors des transporteurs et canaux magnésique présentés, il existe un certain nombre de protéines ayant un rôle putatif dans le maintien de l'homéostasie magnésique. C'est le cas des protéines CNNM qui pourrait exercer la fonction de transporteur magnésique dans la cellule [**Goytain et al. 2005c ; Wang et al. 2003**].

Sur les 4 membres de la famille CNNM seul CNNM3 (Tableau 3 et Figure 21) présente un profil d'expression ubiquitaire et pourraient influencer l'homéostasie magnésique. Il a, par ailleurs, récemment été démontré que son activité était dérégulée dans le cancer [**Hardy et al. 2014**]. D'autres protéines pourraient exercer un rôle dans le transport magnésique comme la protéine NIPA-1 (non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1), néanmoins aucun courant magnésique n'a été enregistré pour ce canal sur un autre modèle que l'ovocyte de *xenopus* [**Goytain et al. 2007**].

3) Rôle du magnésium dans la cellule :

A) Liaison du magnésium aux acides nucléiques :

Le magnésium est un composant nécessaire à l'acquisition et au maintien des structures tertiaires de l'ADN et de l'ARN. Il se lie aux nombreux atomes d'oxygène et d'azote chargés négativement le long des chaînes nucléotidiques. Le magnésium impact tout particulièrement la stabilité des ARN de transfert indispensables au processus de traduction [**Quigley et al. 1978 ; Westhof et al. 1986**] et permettrait la stabilisation des ARN messagers, ribosomiaux, viraux, et autocatalytiques [**DeBaaij et al. 2015**]. La structure tertiaire de l'ADN nécessite également la fixation du magnésium (Figure 21). De plus, le magnésium exerce un effet protecteur sur l'ADN en entrant en compétition avec les ions monovalent et les ROS. En cas de baisse de la concentration magnésique la fixation des ROS à l'ADN est facilitée, conduisant au stress oxydatif [**Price et al. 1992**]. Néanmoins, dans le cadre d'une augmentation de

la concentration nucléaire de magnésium, celui-ci se fixe à l'ADN de façon covalente, provoque une distorsion de la double hélice et induit des effets mutagènes **[Anastassopoulou et al. 2002]**. L'équilibre cellulaire est directement lié au maintien de l'homéostasie magnésique et toute variation importante de sa concentration engendre des effets délétères.

B) Magnésium et activité enzymatique :

De nombreux cations divalents agissent comme cofacteurs enzymatique dans la cellule tel que le Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou encore le Mg^{2+} . Les données actuelles suggèrent que près de 600 enzymes utilisent le magnésium comme cofacteur et la plupart de ces enzymes exercent une activité vitale pour la cellule et donc pour l'organisme. A cela s'ajoutent près de 200 enzymes supplémentaires pour lesquelles le magnésium est un activateur **[Bairoch et al. 2000 ; Caspi et al. 2012]**. Le magnésium est notamment indispensable à l'activité enzymatique et à la stabilité des ADN polymérase **[Brautigam et al. 1998 ; Yang et al. 2004]**. Outre son importance dans la réplication et la protection de l'ADN, le magnésium permet également sa réparation (Figure 21). La quasi intégralité des enzymes impliquées dans la réparation par excision de nucléotides nécessite l'utilisation du magnésium comme cofacteur enzymatique **[Calsou et al. 1994]**, de même que les polymérase et ligases impliquées dans la réparation par excision de bases **[Barzilay et al. 1995 ; Shen et al. 1996]**. De nombreuses kinases, cyclases, topoisomérase, ATPases, ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse protéique comptent parmi les 800 enzymes ayant une activité dépendantes du magnésium (Figures 21 et 22) **[Ban et al. 1999]**. Le magnésium est également présent sous forme liée à l'ATP et est indispensable à de nombreuses enzymes impliquées dans la glycolyse. Le Mg-ATP régule notamment des enzymes indispensables au métabolisme énergétique telles que l'hexokinase, la pyruvate kinase, l'aldolase, etc.... **[Garfinkel et al. 1985 ; Weber et al. 1967]**.

C) Magnésium et signalisation cellulaire :

La signalisation cellulaire est un processus complexe faisant intervenir nombre de molécules de signalisation de nature protéique, lipidique mais également cationique. Le calcium est le cation divalent le plus étudié dans la signalisation cellulaire et est considéré comme le second messenger universel. Le magnésium étant le principale antagoniste du calcium dans la cellule, il est en mesure d'influencer la signalisation cellulaire dépendante du calcique de façon indirecte. Le ratio Mg/Ca est extrêmement important principalement pour l'activité des transporteurs calcique et autres protéines liant le calcium [Iseri *et al.* 1984] De faibles variations de la concentration en magnésium suffisent à influencer la signalisation calcique.

Outre son action antagoniste sur le calcium et son impact indirect sur la signalisation, le magnésium pourrait agir en tant que second messenger intracellulaire. Cette hypothèse repose sur des travaux démontrant que la stimulation des cellules par des facteurs de croissances, notamment EGF et FGF induit une augmentation de la concentration magnésique intracellulaire [Hong *et al.* 2006 ; Hong *et al.* 2009]. L'EGF génèrent également un influx magnésique important *via* l'activation de MagT1, comme cela a pu être reporté sur les lymphocytes-T [Li *et al.* 2011].

Un influx important de magnésium est notamment détecté suite à une stimulation des cellules par l'insuline [Lostroh *et al.* 1974 ; Takaya *et al.* 2000] Il a également été démontré, toujours dans les cellules-T, que le magnésium est capable d'activer la PLC-1 réduisant la phosphorylation de la PKC, la génération d'IP₃ en aval, et l'influx calcique. Néanmoins, d'autres études suggèrent que c'est la PLC-1 qui régule l'influx magnésique et non l'inverse (Figure 22) [Hong *et al.* 2006 ; Hong *et al.* 2009]

A l'inverse du calcium, pour qui il existe un fort gradient de concentration entre les milieux extra et intracellulaire ($[~1,5 \text{ mM}]_e \rightarrow [10-100\text{nM}]_i$), les concentrations magnésiques sont similaire de part et d'autre de la membrane plasmique.

Dans ces conditions, il parait difficile d'envisager le magnésium comme second messenger intracellulaire, car, en l'absence d'un gradient électrochimique fort, l'ouverture des canaux magnésiques suite à un stimulus ne peut engendrer une variation importante de la concentration de magnésium cytosolique. Néanmoins, une étude à démontrée que des cellules déficientes pour MagT1 possèdent une concentration magnésique intracellulaire très faible [Chaigne-Delalande *et al.* 2013]. La régulation de phénomènes cellulaires par le magnésium semble être un

processus complexe. Son rôle en tant que second messenger semble d'avantage s'effectuer sur des périodes de temps longues plutôt que de façon instantané.

4) Magnésium et prolifération cellulaire :

La prolifération cellulaire est un phénomène complexe initié par un signal mitotique perçu par la cellule via l'interface facteur de croissance / récepteur, et poursuivi par une cascade de signalisation intracellulaire. Cette cascade de signalisation aboutit à la transcription de facteurs de croissance nécessaire à la progression du cycle cellulaire et *in fine* à la prolifération. Le magnésium est théoriquement impliqué à tous les niveaux de ce mécanisme (Figure 22). En effet, le magnésium est impliqué dans la stimulation du récepteur, la transcription, la synthèse de protéines et la cascade de phosphorylation permettant la transduction du signal [Cowan *et al.* 1995]. La réplication de l'ADN nécessite également l'apport de magnésium car les polymérases et les ligases sont Mg-ATP dépendantes. De plus, le magnésium joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette nécessaire au processus de cytokinèse [Wolf *et al.* 2008]. L'ensemble des données obtenues concernant le magnésium et la prolifération cellulaire montrent que les cellules mitotiques présentent une concentration magnésique intracellulaire plus importante que les cellules au repos [Wolf *et al.* 1999 ; Wolf *et al.* 2004]. Mais également que la concentration magnésique intracellulaire est finement régulée et dépend de la disponibilité en magnésium extracellulaire. De plus, il a été démontré que les cellules cancéreuses qui prolifèrent de façon aberrante dépendent moins des concentrations extracellulaire du magnésium, ce phénomène suggère que leur activité est régulée positivement dans la cellule cancéreuse [Wolf *et al.* 2007]. De par son rôle primordial dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines, le magnésium est un important régulateur de la prolifération cellulaire. De plus, de nombreuses études se sont penchées sur l'impact du magnésium dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la réponse aux facteurs de croissances [Rubin *et al.* 1978 ; Rubin *et al.* 1975].

Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration de magnésium intracellulaire amplifie la synthèse protéique et favorise la prolifération cellulaire.

L'effet du magnésium sur la synthèse protéique est extrêmement rapide et est perceptible 1h après supplémentation magnésique, alors que ses répercussions sur la synthèse d'ADN sont plus tardives (~10h) [Kim *et al.* 1968]

De façon intéressante, la concentration de magnésium est finement régulée suite à l'activation de la prolifération par des facteurs de croissances. Ainsi, Sanui et collaborateurs ont démontrés que la concentration magnésique était 20% plus élevée 16h après stimulation des cellules par l'insuline en comparaison avec la concentration magnésique basale (avant stimulus) [Sanui *et al.* 1978]. Des études plus récentes utilisant la sonde magnésique Mag-Fura2 (cf. Matériel et Méthode) ont permis de mesurer une augmentation de la concentration magnésique intracellulaire passant de 0,3 à 1,4 mM, 20 minutes après stimulation à l'EGF [Grubbs *et al.* 1991].

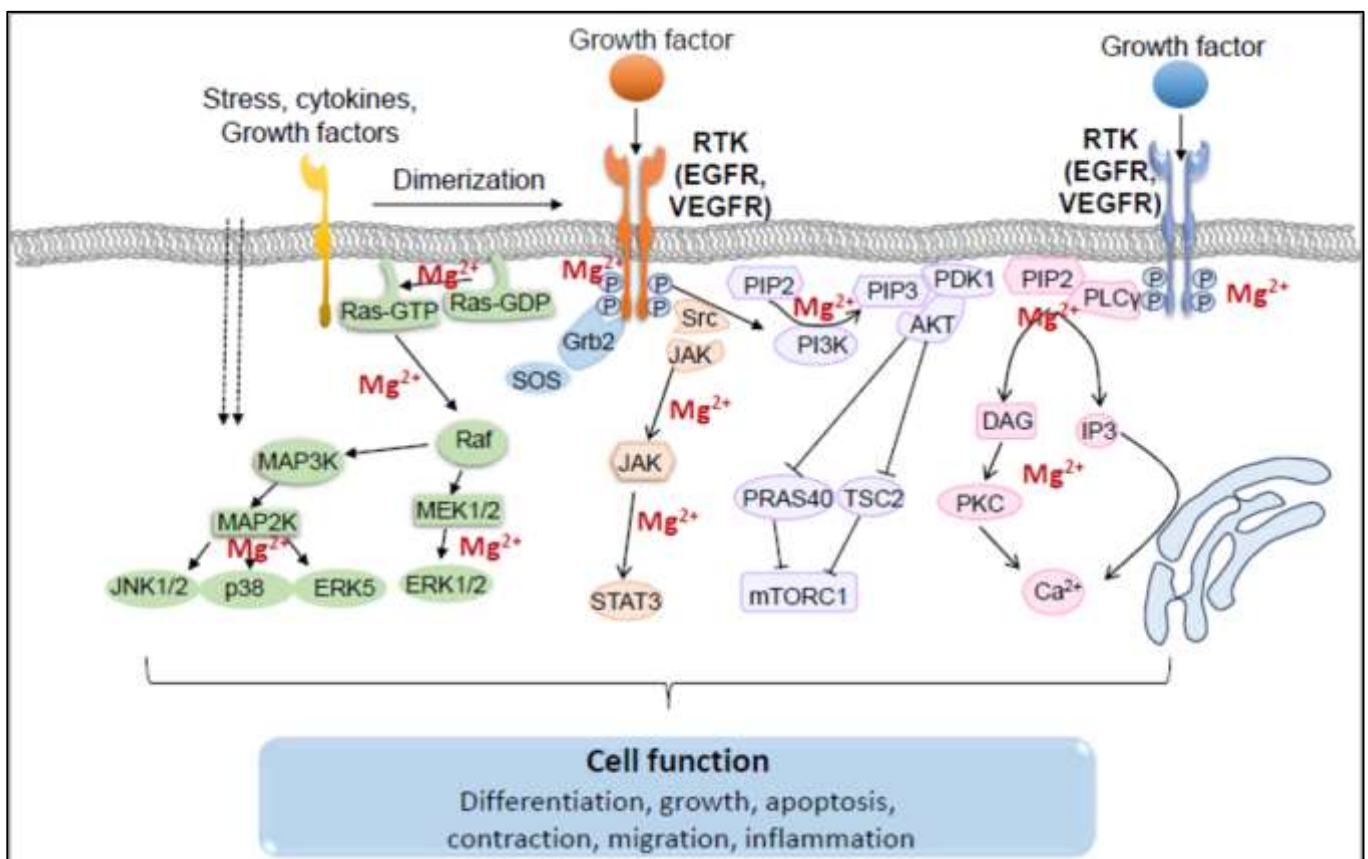


Figure 22) Rôle du magnésium dans la signalisation cellulaire :

Le schéma représente les voies de signalisations déclenchées par l'activation de RTK tel que les MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR. Le magnésium est impliqué dans la signalisation en tant que cofacteur enzymatique et influence les mécanismes cellulaires tel que la prolifération, la contraction, la différenciation ou encore la migration.

D'après [Zhou *et al.* 2019].

Comme cela a été évoqué, une augmentation de la concentration de magnésium intracellulaire précède la synthèse d'ADN et coïncide avec la période de protéosynthèse dans la cellule mitotique.

Des études réalisées en vue d'élucider le mécanisme de prolifération cellulaire dépendante du magnésium, ont permis l'élaboration du modèle dit « triple M » (Membrane, Mitosis, Magnesium) (Figure 21) [Rubin *et al.* 2005]. Ce modèle apporte une explication concernant l'origine de l'élévation de la concentration magnésique suite à une stimulation par un facteur de croissance. En effet, la fixation d'un facteur de croissance à son récepteur membranaire favoriserait un relargage du magnésium lié aux phospholipides membranaires, le magnésium libre contribuant à l'activité ribosomal et à la synthèse de protéine. Le modèle triple M suggère également le rôle principal joué par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) dans la prolifération dépendante du magnésium [Weber *et al.* 2012]. Le facteur de croissance, en se liant à son récepteur membranaire, provoque la phosphorylation de la PI3K (phosphoinositide-3-kinase) qui active à son tour mTOR [Rubin *et al.* 2005 ; Wang *et al.* 2009] L'activation de mTOR est Mg-ATP dépendante, cette enzyme présente une affinité pour le Mg-ATP extrêmement importante ($K_m \sim 100\text{mM}$). Aucune variation de la concentration d'ATP n'a été observée alors que le magnésium intracellulaire augmente suite à la stimulation par un facteur de croissance. Ainsi, la fixation du facteur de croissance sur son RTK permet d'une part l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et l'augmentation magnésique nécessaire à l'activité sérine/thréonine kinase de mTOR. Le modèle triple M place donc le magnésium comme acteur principal de la prolifération cellulaire via PI3K/AKT/mTOR.

Il existe également un lien entre la prolifération et l'expression des canaux magnésiques. Une étude de Tani et collaborateurs a démontré que les canaux calciques CRAC (Calcium Release-Activated Channels) impliqués dans le maintien des réserves calciques intracellulaires voient leur expression varier à de nombreuses reprises au cours des différentes phases du cycle cellulaire. De façon intéressante, l'expression du canal TRPM7 augmente uniquement au cours de la phase G1 et reste stable pendant les autres phases du cycle. [Tani *et al.* 2007] Ces résultats suggèrent qu'il existe une différence entre la régulation calcique rapide et une régulation magnésique s'effectuant dans le temps [Grubbs *et al.* 1987].

L'augmentation de l'expression de canaux perméables au magnésium coïnciderait avec l'influx magnésique intervenant en phase G1 impliqué dans la régulation de la cycline D, de cdk4 et de P21^{cip1} et P27^{kip1} dans les cellules épithéliales mammaires et les CMLV. **[Nasulewicz et al. 2004 ; Sgambato et al. 2001]** Ces travaux confirment le lien établi par Rubin et collaborateurs entre la synthèse protéique nécessaire à la progression en phase G1, et le magnésium intracellulaire. **[Rubin et al. 1975 ; Rubin et al. 2007]**

Une étude a permis de démontrer qu'une concentration extracellulaire de magnésium de 2 mM permet de réguler positivement l'expression de la cyclin D1 et de Cdk-4 ainsi que d'inhiber l'expression de P21^{cip1} et P27^{kip1} sur CMLV en culture. L'effet prolifératif induit *via* les acteurs cités est dépendant de ERK_{1/2}. La concentration magnésique extracellulaire de 2 mM multiplie également la synthèse protéique par 3 sur ce modèle cellulaire **[Touyz et al. 2003]**.

L'effet inhibiteur du magnésium sur les protéines P21^{cip1} et P27^{kip1} a été confirmé sur cellules épithéliales mammaires en condition de culture hyper et hypomagnésémique **[Sgambato et al. 1999]**.

Wolf et collaborateurs proposent une cascade d'évènements intracellulaires impliquant la régulation négative de l'apparition de ROS par le magnésium (par compétition avec les cations monovalents). En cas de diminution du magnésium intracellulaire, cela engendre une augmentation des ROS influençant directement l'intégrité de l'ADN, ce qui active P53, P21^{cip1} et P27^{kip1} et inhibe la progression dans le cycle cellulaire. Cette hypothèse est supportée par l'activation du facteur NF κ B, connu pour être activé par les ROS, en condition de culture hypomagnésémique. **[Gloire et al. 2006 ; Altura et al. 2003]** De plus, les cellules cultivées dans un milieu dépourvu de magnésium voient l'expression de la GST (Glutathion S-transferase), une enzyme impliquée dans la dégradation des ROS. Une supplémentation magnésique permet de rétablir l'expression de la GST à un niveau contrôle **[Wolf et al. 2008]**. D'autres études ont permis de confirmer le rôle de la GST dans la prolifération dépendante du magnésium notamment dans les hépatocytes et leucocytes **[Paumi et al. 2004 ; Holley et al. 2007 ; Wolf et al. 2008]**.

L'influx magnésique est modulé par l'interaction d'un facteur de croissance avec son récepteur comme démontré sur cardiomyocytes, hépatocytes, CMLV et myocytes

[Romani et al. 2007 ; Touyz et al. 1996 ; Grubbs et al. 1991 ; Touyz et al. 2003] Il a été démontré que les cellules cultivées en conditions hypo-magnésique sur exprime le régulateurs du cycle cellulaire P27^{kip1}. **[Covacci et al. 1998 ; Sgambato et al. 2001]** De plus, le manque de magnésium induit également une augmentation de P21^{cip1} dans les cellules endothéliales et les CMLV **[Bernardini et al. 2005 ; Touyz et al. 2003]**. Placer les cellules en condition hypo magnésique mime l'effet d'inhibiteur de la prolifération sur l'activité de P53 dans les cellules endothéliales **[Wolf et al. 2008]** Les effets prolifératifs induits par le magnésium intracellulaire semblent directement liés au maintien de l'intégrité de l'ADN. Le magnésium régule la progression du cycle cellulaire en influençant l'expression de P53. Dans leur ensemble, ces résultats démontrent que le magnésium exerce un rôle positif sur la prolifération cellulaire en régulant les principaux inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire.

5) Magnésium et cancer :

Toute dérégulation de la concentration magnésique provoque des troubles pathologiques. Il a été démontré que les cellules tumorales contiennent une concentration intracellulaire de magnésium élevée comparé aux cellules saines **[Taylor et al. 1991]**. De plus, des études démontrent que dans les cellules cancéreuses mammaires le magnésium continue à pénétrer dans les cellules même lorsque la concentration magnésique extracellulaire diminue sous les limites physiologiques **[Guilbert et al. 2009 ; Jiang et al. 2007 ; Wolf et al. 2004]**. Cet état de fait suggère que les transporteurs et canaux magnésiques voient leur expression et/ ou leur activité perturbées dans le cancer **[Wolf et al. 2007]**.

De nombreux canaux magnésique sont connus pour être impliqués dans le développement du cancer. Il a notamment été démontré que l'influx magnésique *via* le canal TRPM7 stimule la prolifération des cellules tumorales **[Guilbert et al. 2009 ; Jiang et al. 2007]** Ce même canal est d'ailleurs surexprimé dans les tissus de cancers hépatique, gastrique, de cancer du sein et d'ACP. **[Guilbert et al. 2009 ;**

Kim et al. 2008 ; Mishra et al. 2009 ; Yee et al. 2011]. Le transporteur magnésique CNNM3 voit également son expression augmenter dans les tissus de cancer mammaire [**Hardy et al. 2014**]. Son activité est également modulée dans le cancer puisque CNNM3 se lie à l'oncogène PRL2 afin de faciliter l'entrée magnésique et augmenter la prolifération des cellules cancéreuses [**Hardy et al. 2014**]. Le canal MagT1 est également surexprimé dans le cancer colorectal, ovarien et le carcinome hépatocellulaire [**Zheng et al. 2019 ; Molee et al. 2015 ; Cazzaniga et al. 2017 ; Willis et al. 2016**]. Il a notamment été démontré dans le cancer colorectal que les tumeurs à un stade avancé, présentant des métastases et associées à un taux de survie faible sont celles exprimant le plus MagT1 [**Zheng et al. 2019**]. L'élévation de la concentration magnésique intracellulaire serait bénéfique à la croissance de la tumeur. En effet, le magnésium est impliqué dans la régulation de l'activité de nombreuses enzymes associées au cancer telles que la télomérase et la phosphatase 1D (PPM1D) (Figure 23) [**Castiglioni et al. 2011**].

Ainsi, le magnésium favorise la reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules et l'immortalité répliquative caractéristique des cellules cancéreuses (Figure 23) [**Castiglioni et al. 2011**]. Néanmoins le rôle du magnésium dans la régulation de l'activité des enzymes dans le cancer n'a jamais été vérifié et reste hypothétique. De plus, le magnésium favorise également l'inactivation de P53 et la prolifération cellulaire dans le cadre du cancer [**Castiglioni et al. 2011 ; Wolf et al. 2008**].

Alors que la prolifération tumorale est rattachée à des concentrations magnésiques intracellulaires fortes, de faibles concentrations favorisent la carcinogenèse et la génération de métastases [**Wolf et al. 2008 ; Castiglioni et al. 2011**].

Des conditions hypomagnésémiques entraînent une diminution de l'activité de réparation de l'ADN et une perte de la protection contre les ROS (Figure 23). Le manque de magnésium favorise donc la mise en place de l'inflammation et du stress oxydatif favorable à l'acquisition de mutation initiatrice de la cancérogenèse. Mais également à l'accumulation de mutations successives favorables aux transitions phénotypiques impliquées dans l'invasion et la migration des clones tumoraux.

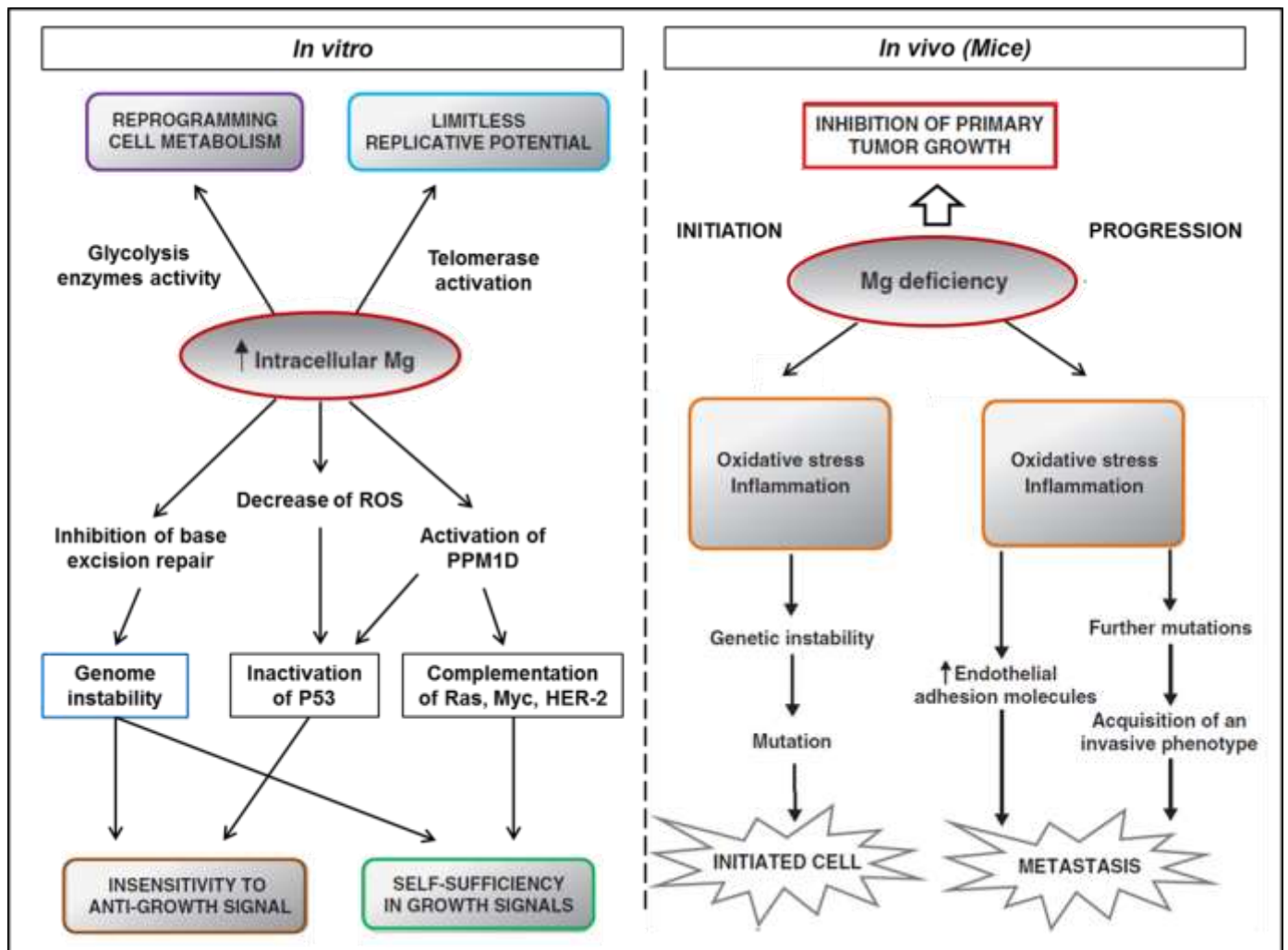


Figure 23) Implication du magnésium dans l'initiation et la progression cancéreuse :

Schéma représentant les effets attestés du magnésium dans le cancer, *in vitro* et *in vivo*. La concentration magnésique cytosolique élevée dans la cellule cancéreuse favorise l'instabilité génétique, la reprogrammation énergétique ainsi que la prolifération cellulaire. De faibles apports magnésiques inhibent la croissance tumorale mais favorisent la cancérogenèse en facilitant les effets mutagènes des ROS *in vivo*.

Modifié d'après [Castiglioni *et al.* 2010].

De plus, des études cliniques ont démontrées qu'un régime alimentaire pauvre en magnésium est associé à une augmentation de l'incidence des cancers colorectal [Folsom *et al.* 2006 ; Larsson *et al.* 2005 ; Van den Brandt *et al.* 2007] et pancréatique [Dibaba *et al.* 2015]. Concernant l'ACP il est d'ailleurs précisé qu'une diminution de l'apport magnésique quotidien de 100 mg augmente le risque de développer un ACP de 24% chez les patients testés. [Dibaba *et al.* 2015]. De la même façon, il a été démontré qu'une supplémentation magnésique exerce un effet

protecteur et diminue l'incidence du cancer de l'œsophage [Yang *et al.* 2002] et du carcinome hépatique [Tukiendorf *et al.* 2004]

Le magnésium exercerait également un effet protecteur contre le cancer mammaire. En effet, il a été démontré qu'un ratio sérique calcium/magnésium élevé augmente le risque de développer un cancer du sein post-ménopausique chez la femme [Sahmoun *et al.* 2010]. Cette effet est lié à l'antagonisme existant entre les deux cations et est renforcé par les protocoles de prévention de l'ostéoporose post-ménopausique préconisant une forte consommation de calcium. [Sahmoun *et al.* 2010]. Un faible apport magnésique est associé à l'inflammation dans le cadre du cancer. [Nielsen *et al.* 2010] Le processus inflammatoire est connu pour favoriser le développement du cancer en favorisant l'instabilité génomique, la dissémination métastatique et la résistance aux thérapies [Colotta *et al.* 2009].

Il existe donc un lien ambigu entre le magnésium et le cancer puisque celui-ci prévient l'apparition du cancer mais favorise l'activité des cellules cancéreuses (Figure 23).

CHAPITRE 5) LE CHANZYME TRPM7 :

I) Généralités sur les canaux ioniques :

Les canaux ioniques sont indispensables à de très nombreux processus physiologiques, et au maintien des grandes fonctions cellulaires. Il s'agit de protéines transmembranaires permettant le passage des ions à travers la bicouche phospholipidique. Il existe des canaux ioniques exprimés à la surface de la membrane plasmique mais également sur les membranes d'organites tels que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou encore l'appareil de Golgi. Les canaux ioniques ne nécessitent pas d'apport énergétique pour fonctionner, ils sont considérés comme des transporteurs passifs. Comme toutes les protéines, les canaux ioniques possèdent une structure conditionnant leur fonction. La base structurelle commune des canaux ioniques est constituée d'un pore formé par l'association d'un nombre variable de sous-unités protéiques, ainsi que d'un filtre de sélectivité qui conditionne la perméabilité du canal [Hill, 2001].

Il existe une grande diversité de canaux ioniques dans les cellules, qui diffèrent en fonction de leur perméabilité, de leur structure ou encore de leur mode d'activation.

Les canaux ioniques peuvent être classés en fonction de leur sélectivité, on parle alors de canaux sodiques, calciques, magnésiques, potassiques. Il est également possible de discriminer les modes d'activation des canaux, il existe des canaux voltage-dépendants (VOC), activés par des seconds messagers intracellulaires (SMOC), par la fixation d'un ligand à son récepteur (ROC) ou encore par la déplétion calcique réticulaire (SOC) **[Hill, 2001]**.

Tout processus physiologique tel que la prolifération ou encore la survie cellulaire implique les ions, ceux-ci sont indispensables à l'activité métabolique, à la mise en place du gradient osmotique, à l'acquisition et au maintien de la structure des molécules, et permettent la fusion vésiculaire. Certaines espèces ioniques sont employées comme seconds messagers dans les voies de signalisation intracellulaires comme le calcium ou encore comme cofacteurs enzymatiques comme le zinc, le manganèse ou encore le magnésium **[Hill, 2001]**. Il est à noter que les canaux ioniques représentent le deuxième groupe de protéines les plus ciblées par des drogues pharmacologiques après les RCPG (Récepteur Couplés aux Protéines G) **[Overington et al. 2006]**.

Toute variation de l'expression et/ou de l'activité des canaux ioniques engendre une dérégulation de l'équilibre cellulaire. Le terme de « canalopathie » est d'ailleurs employé pour décrire une pathologie dépendante de la dérégulation de canaux ioniques **[Lehmann-Horn et al. 1999]**.

L'implication des canaux ioniques dans l'initiation, la progression tumorale et la formation de métastases a également été démontrée sur de nombreux modèles de cancer **[Prevarskaya et al. 2010]**. De plus, les canaux ioniques voient leur expression modulée dans le cancer et agissent pour la majeure partie d'entre eux comme des oncogènes **[Deliot et al. 2015]**.

II) La famille des canaux TRP :

Les canaux appartenant à la famille des TRP (Transient Receptor Potential) tiennent leur appellation d'une expérience menée par Montell et collaborateurs en 1985. Dans cette expérience effectuée sur des photorécepteurs de drosophile pour lesquels le gène *trp* a été muté, les chercheurs ont enregistré une activité transitoire en réponse à un stimulus lumineux important. **[Montell et al. 1985]**. Les canaux TRP sont, aujourd'hui, mieux connus et pour la plupart bien caractérisés. On dénombre près de 7 sous-familles différentes, classées en fonction de leur homologie structurale, chacune contenant entre 1 et 8 membres (Figure 24). On dénombre près de 6 familles de TRP chez l'homme caractérisées en fonction de leurs structures et de leurs modes d'activation. Cette grande famille regroupe, au finale, 29 membres dont 27 d'entre eux sont exprimés chez les mammifères. Ainsi, les mammifères expriment les TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), TRPP (Polycystin), les TRPML (Mucolipin) et les TRPA (Akyrin) **[Clapham et al. 2003]**. Ces canaux sont majoritairement localisés à la membrane plasmique et leur profil d'expression varie beaucoup en fonction du membre en question. Certains canaux sont ubiquitaires comme le canal TRPM7 alors que d'autres ont une expression restreinte à certains tissus comme les canaux TRPM6 exprimés dans les reins et les intestins. Bien que possédant des éléments de structure différents, l'ensemble des canaux TRP ont une base architecturale commune. Les TRP sont tous constitués de 6 domaines transmembranaires, d'un pore délimité par les segments 5 et 6, de régions N et C-terminales cytosoliques, ainsi que de domaine TRP hautement conservés **[Wu et al. 2010]**. Tous les canaux TRP sont fonctionnels après s'être assemblés en un complexe de 4 sous-unités α , ils sont d'ailleurs en mesure de former des homo comme des hétérotétramères (ex : TRPM7/TRPM6) **[Clapham et al. 2001]**. Les canaux TRP sont perméables aux cations dans le sens large, néanmoins certains canaux présentent une sélectivité spécifique. Ainsi, les canaux TRPV5 et 6 ne sont perméables qu'au Ca^{2+} , le canal TRPM4 au Na^+ , et les canaux TRPM6 et TRPM7 au Mg^{2+} (Figures 24 et 25).

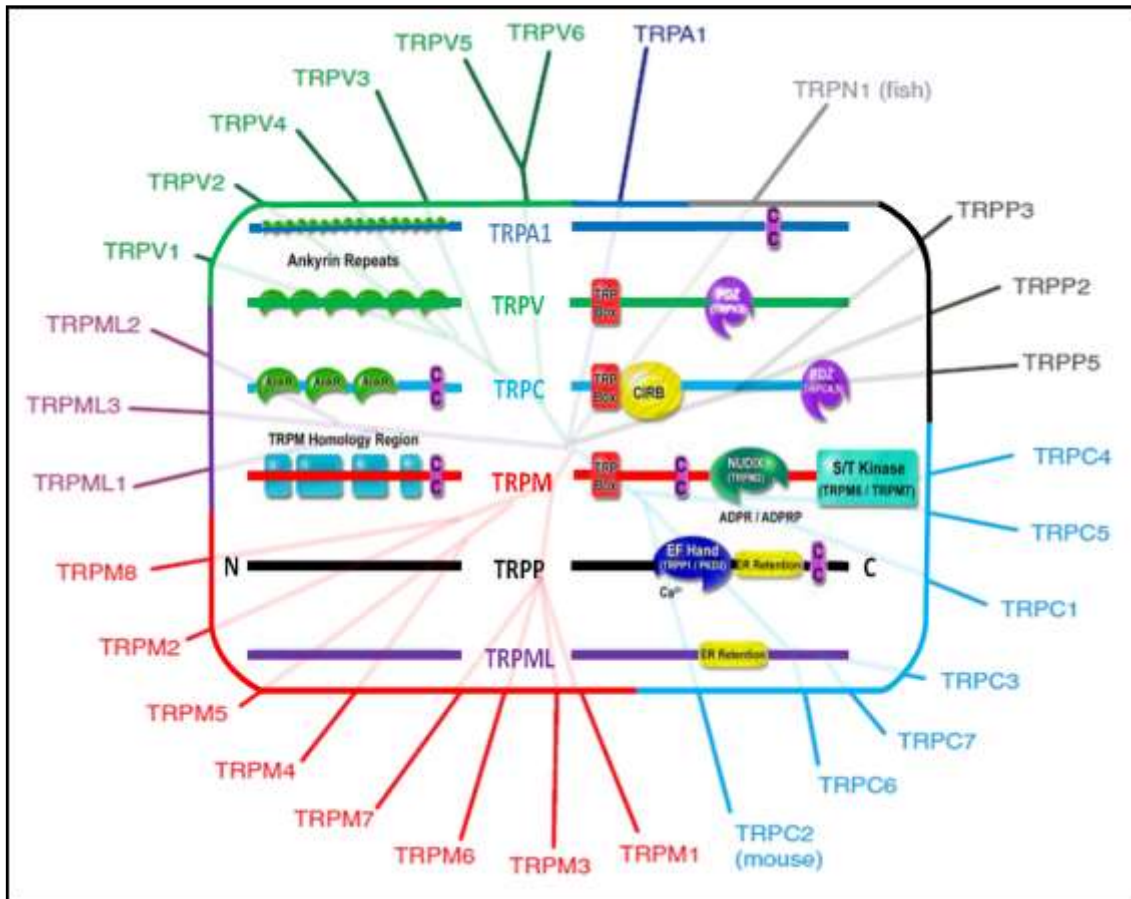


Figure 24) Arbre Phylogénétique et Particularités structurales des canaux TRP :

Arbre Phylogénétique présentant les différents membres de la famille TRP ainsi que les structures de bases des différentes sous-familles. Les structures conservées des canaux TRPA (« Ankyrin »), TRPV (« Vanilloïde »), TRPP (« Polycystine »), TRPM (« Melastatine »), TRPML (« Mucolipine »), et TRPC (« Canonique ») sont présentées au centre. Seules les structures des sous-familles de TRP exprimées chez l'Homme sont représentées. TRPN (« NOMPC ») « AnR » / « Ankyrin Repeats » : domaine Ankyrin ; « CC » : Coiled Coiled Region ; « PDZ » : domaine de liaison au cytosquelette ; « CIRB » : site de liaison à la calmoduline et à l'IP3R (récepteur à l'IP3) ; « Nudix » : ADP-Ribose hydrolase de TRPM2 ; « S/T Kinase » : Sérine / Thréonine Kinase de TRPM6 et 7 ; « EF-Hand » : domaine de liaison au calcium ; « ER retention » : signal de rétention dans le réticulum endoplasmique.

Modifié d'après [Nilius et Owsianik, 2011 et Clapham *et al.* 2003].

L'ensemble des TRP présente une sensibilité à l'inhibition pharmacologique par le 2-APB (2-Aminoéthoxydiphényl borate) [Clapham *et al.* 2001].

Les mécanismes de régulation des canaux TRP restent mal connus, ils pourraient être régulés par la PLC ou encore le PIP2 [Wu *et al.* 2010].

Concernant les particularités inhérente à plusieurs sous-type on peut notamment citer : les motifs Ankyrin répétés au niveau des extrémités N-terminales des TRPC, TRPV et TRPA, ou encore les domaines riches en proline situés en C-ter sur les canaux TRPV, TRPM et TRPC. La famille des TRPM, en plus des domaines mélastatine qui la caractérise, possède 3 membres qualifiés de « chanzyme » (contraction de « channel » et « enzyme ») en raison de leur activité enzymatique. L'activité enzymatique est générée par un domaine ADP-ribose hydrolase pour le canal TRPM2 ou par une sérine / thréonine kinase positionnée en C-ter pour TRPM6 et TRPM7.(Figure 24) **[Sharenberg et al. 2005 ; Runnels et al. 2001]**.

D'un point de vue fonctionnel, les canaux TRP sont activés par toute sorte de stimuli. Ils sont impliqués dans la photoréception, thermoréception, la nociception ou encore dans la perception du goût et du touché. Les canaux TRP seraient d'ailleurs très importants pour le fonctionnement du système sensoriel **[Montell et al. 2002]**

Les canaux TRP, sont par ailleurs, impliqués dans de nombreux processus physiologiques tel que la croissance, la différenciation, la survie, la migration cellulaire et le remodelage du cytosquelette. **[Pedersen et al. 2005 ; Clark et al. 2008]**.

Néanmoins, l'ensemble de ces canaux n'impactent pas le fonctionnement cellulaire avec une importance égale. Il existe une grande diversité concernant le profil d'expression et les processus régulés par chaque canal TRP individuellement. L'étude approfondie du rôle de chaque TRP dans la physiologie comme en pathologie a permis de mettre en évidence l'importance de certains membres dans des processus en particulier, comme la différenciation ou encore la prolifération cellulaire.

III) Le canal TRPM7 :

1) Structure et fonction :

Le canal TRPM7 est un canal cationique non-sélectif sensible au magnésium et dont l'expression est ubiquitaire. Bien qu'il soit non-sélectif, il possède une affinité particulière pour les cations divalents. TRPM7 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques ainsi que physiopathologique chez l'homme. Il régule

notamment l'homéostasie magnésique cellulaire et tissulaire, l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du Mg^{2+} , au même titre que le canal TRPM6 avec qui il partage plus de 50% d'homologie de séquence. Bien qu'ubiquitaire il est plus exprimé dans le foie, les os, les adipocytes et le cœur, il est exprimé dans les stades précoces de développement et il est indispensable au développement embryonnaire. [Penner *et al.* 2007 ; Jin *et al.* 2012] Le canal TRPM7 possède une structure commune à tous les TRP mais également un domaine enzymatique positionné au niveau de l'extrémité intracellulaire C-terminale (Figures 24 et 25). On parle alors de « chanzyme » pour ce canal car il est le résultat de la fusion entre un canal et une

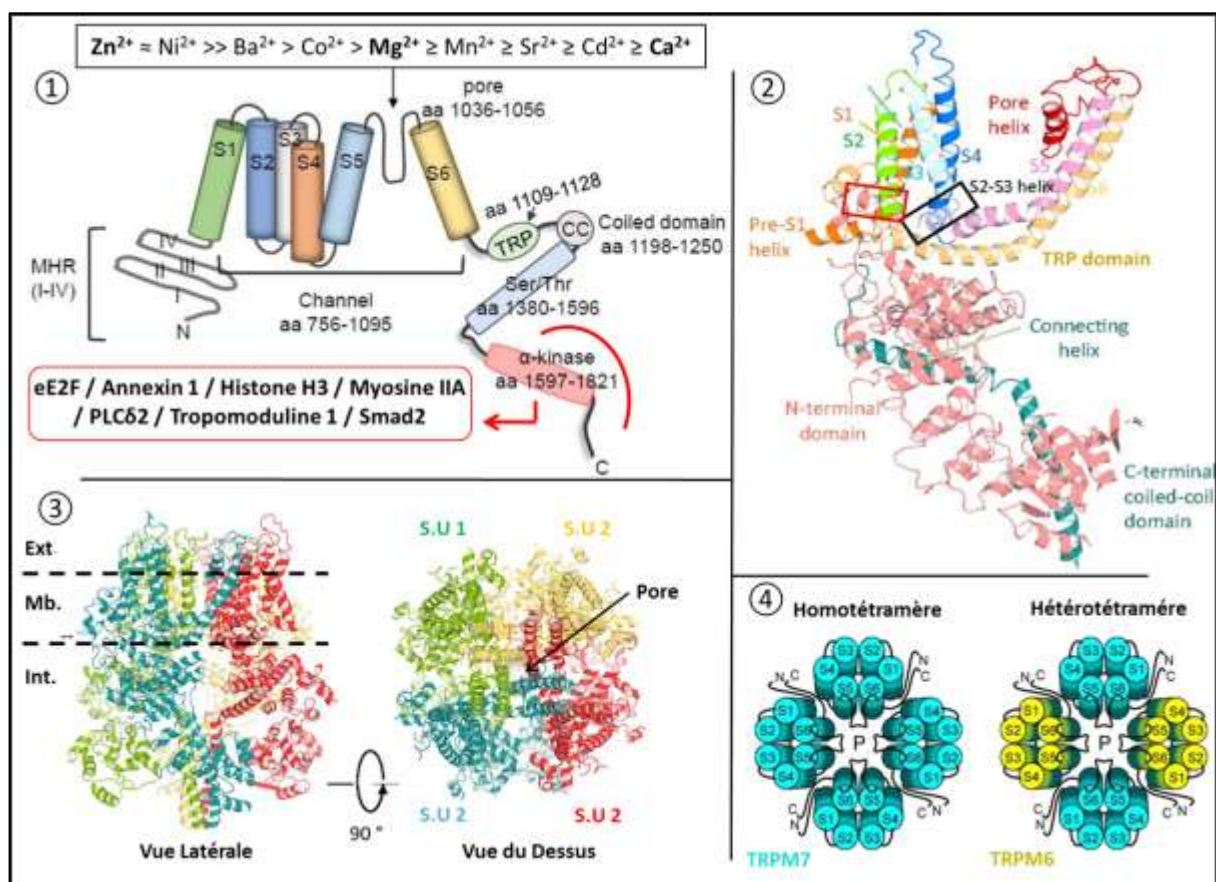


Figure 25) Caractéristiques structurales et fonctionnelles du canal TRPM7 :

Représentation des caractéristiques structurales et fonctionnelles de TRPM7 ; 1) Structure d'une sous unité du canal TRPM7 faisant apparaître les 6 segments transmembranaires, le pore, ainsi que les principales régions identifiées : domaine kinase, domaine CCR, Boite TRP, domaine Mélastatine (« MHR »). L'ordre de perméabilité du canal, ainsi que les principaux substrats de la kinase sont également renseignés. 2) Structure tertiaire d'une sous-unité de TRPM7, avec en rouge : l'hélice hydrophobe ; et en noir les hélices S2, et S3. 3) Association de 4 sous-unités (« S.U1 », 2, 3 et 4) de TRPM7 en un canal fonctionnel, en vue latérale et de dessus ; « Ext. » : Milieu Extracellulaire ; « Mb. » : Membrane plasmique ; « Int. » : Milieu intracellulaire. 4) Présentation schématique de l'association du canal TRPM7 (bleu) en homotétramère ou en hétérotétramère avec le canal TRPM6 (jaune).

Modifié d'après [Zou *et al.* 2019 ; Duan *et al.* 2018 et Nilius et Owsianik, 2011].

kinase. La découverte de ce canal est récente (2001), il est désigné dans un premier temps par les appellations « LTRPC7 » et « TRP-PLIK » (TRP-Phospholipase-C interacting kinase) en raison de sa régulation par la PLC [**Nadler et al. 2001 ; Runnels et al. 2001**] Le canal TRPM7 est une protéine d'un poids moléculaire relativement élevé (210 kDa), et chacune de ces 4 sous-unités alpha compte 1863 acides aminés (Figure 25).

Outre les 6 domaines transmembranaires caractéristiques des TRP, le canal TRPM7 possède des domaines Melastatin en région N-terminale. Ces domaines sont communs aux 8 membres de la sous famille TRPM, leur fonction demeure inconnue à l'heure actuelle [**Hantute-Ghesquier et al. 2018**]. Les canaux TRPM7 possèdent également un domaine TRP noté CCR (Coiled-Coil Region) ainsi qu'un domaine kinase fonctionnel appartenant à la famille des alpha-kinases. Le domaine CCR est probablement impliqué dans la tétramérisation du canal en permettant l'interaction entre les sous-unités [**Mei et al. 2006**]. Il a également été démontré que le domaine CCR permet de réguler l'affinité du canal TRPM7 pour le magnésium [**Jansen et al. 2016**].

Il possède également un site de fixation au PIP2 (Phosphoinositol di-phosphate), 3 sites de liaison putatifs à la PI3K, ainsi que des domaines pouvant être phosphorylés par la PKA et la PKC. Il est à noter que les extrémités C et N-terminales du canal sont toutes deux cytosoliques [**Hantute-Ghesquier et al. 2018**]. Enfin, le canal TRPM7 est capable de former des hétérotétramère avec le canal magnésique avec lequel il partage 50% d'homologie structurelle. L'activité du tétramère diffère entre une conformation homo ou hétérotétramérique. Il a notamment été démontré que les hétérotétramères génèrent un courant cationique de plus forte amplitude que les homotétramères de TRPM7 [**Chubanov et al. 2004**]. Ils présentent également une plus grande sensibilité à l'inhibition par le magnésium libre ou lié à l'ATP et serait bien plus actif que les homotétramères de TRPM7 en condition physiologique une concentration magnésique proche de 1mM [**Ferioli et al. 2017**].

2) Caractérisation électrophysiologique :

La caractérisation électrophysiologique de TRPM7 révèle un courant cationique non-sélectif, caractérisé par un potentiel d'inversion proche de 0mV (Figure 26). Ce courant cationique, typique du canal est appelé courant MIC (Magnesium Inhibited Cationic). Il est caractérisé par une entrée de cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) pour des potentiels de membrane négatifs et par un courant rectifiant dans le sens sortant (K^+ ou Cs^+ en fonction des conditions expérimentales) pour des potentiels de membrane positifs. Comme sa dénomination l'indique, le courant MIC est inhibé par le Mg^{2+} ou de Mg^{2+} -ATP intracellulaire à des concentrations intracellulaires de l'ordre du millimolaire (mM) (Figures 26 et 29). [Nadler *et al.* 2001 ; Runnels *et al.* 2001].

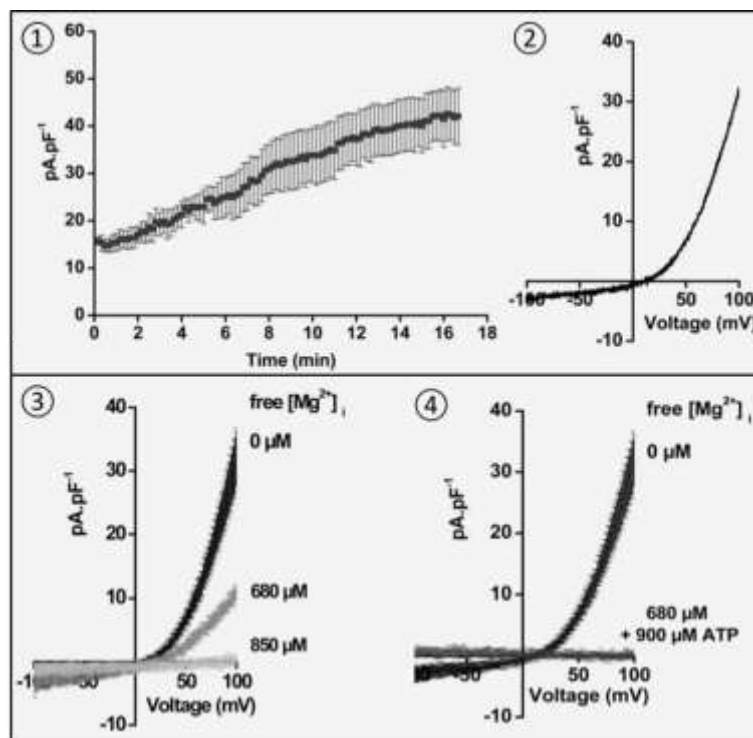


Figure 26) Caractéristiques électrophysiologiques du canal TRPM7 :

1) Développement du courant MIC au cours du temps en patch clamp, configuration cellule entière. La dialyse du milieu intracellulaire avec le milieu intra-pipette ne contenant pas de magnésium permet le développement progressif du courant sortant en levant l'inhibition du courant par le Mg^{2+} . Le courant est normalisé par la capacité membranaire de la cellule, exprimé en pF (pico Farad) 2) Représentation typique du courant MIC en fonction du potentiel imposé exprimé en Volt. On constate un faible courant entrant pour des potentiels imposés négatifs et un fort courant sortant à +100 mV. Le potentiel d'inversion est situé aux alentours de 0 mV ce qui indique l'absence de sélectivité du canal. 3) Inhibition du courant MIC par le magnésium libre de façon concentration dépendante. 4) Inhibition du courant MIC par le Mg-ATP de façon concentration dépendante.

D'après [Rybarczyk *et al.* 2012].

Le canal TRPM7 permet le passage de nombreux ions, principalement des cations divalents. Il existe néanmoins un ordre de perméabilité entre les multiples espèces ioniques perméantes établi comme suit : $Zn^{2+} \approx Ni^{2+} \gg Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Sr^{2+} \geq Cd^{2+} \geq Ca^{2+}$ (Figure 25) [Monteilh-Zoller *et al.* 2003]. Le canal est également perméable aux ions H^+ lorsque les valeurs de pH extracellulaire sont faibles. En effet l'acidification du pH extracellulaire induit un fort courant entrant inhibé par le Ca^{2+} et le Mg^{2+} qui entrent en compétition avec les protons H^+ [Numata *et al.* 2008].

3) Le domaine kinase de TRPM7 :

Des études de la structure protéique ont démontré que 3 membres de la famille TRPM possèdent un domaine enzymatique, outre le canal TRPM2 possédant une activité ADP-ribose hydrolase, seuls les canaux TRPM7 et TRPM6 possèdent un domaine kinase appartenant à la famille des α -kinase (Figures 24, 25 et 27). [Hantute-Ghesquier *et al.* 2018]. Ils sont d'ailleurs appelés respectivement CHAK1 (CHannel Kinase 1) et CHAK2 dans la nomenclature, tant cette particularité enzymatique est indissociable de leur identité. L' α -kinase de TRPM7 possède un site catalytique typique des sérine / thréonine kinases (Figure 27). Elle est constituée de 6 hélices- α et de 15 feuillets- β répartis en 2 lobes, un lobe en C-terminal permettant de stabiliser la protéine via la fixation d'un ion Zinc, et un lobe N-terminales permettant la fixation de l'ATP. Le groupement phosphate se lie à la région séparant les 2 lobes protéiques. Il a été démontré que 2 domaines kinase peuvent s'assembler pour former un dimère via certains résidus N-terminaux (Figure 27) [Yamaguchi *et al.* 2001 ; Ryazanova *et al.* 2004 ; Crawley *et al.* 2009]. La kinase de TRPM7 est connue pour phosphoryler de nombreux substrats tel que l'annexine 1, la Myosine IIA (MYIIA) ou encore, plus récemment la protéine de signalisation Smad2 (Figure 25). [Romagnani *et al.* 2017].

La kinase de TRPM7 phosphoryle l'annexin 1 sur un résidu Ser 5 et en modifie la fonction ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'inflammation et la prolifération cellulaire [Dorovkov *et al.* 2004]. La kinase de TRPM7 est également connue pour

réguler l'apoptose cellulaire en modifiant l'adressage de l'annexine 1 au noyau via phosphorylation de la myosine-IIa [Zhao *et al.* 2015]. La phosphorylation de la chaîne lourde de myosine-IIa par TRPM7 sur des résidus Thréonine 1800, Sérine 1803 et Sérine 1808 module la stabilité du filament et pourrait induire des modifications de l'organisation du cytosquelette (Figure 25) [Clark *et al.* 2008]. La phosphorylation de la MYIIA permet également la migration des cellules cancéreuses du sein ER⁻ (Œstrogène Receptor negative) en modifiant l'organisation du cytosquelette [Guilbert *et al.* 2013].

La MYIIA n'est pas le seul substrat de l' α -kinase de TRPM7 issue du cytosquelette. Il a été démontré que le canal TRPM7 phosphoryle la tropomoduline 1 réduisant ses capacités à interagir avec les filaments d'actine [Dorovkov *et al.* 2008 ; Ryazanova *et al.* 2004].

TRPM7 compte également parmi ses substrats la PLC γ 2 qu'il peut phosphoryler en Sérine 1164 et Thréonine 1045 [Deason-Towne *et al.* 2012]. Une étude récente de Romagnani et collaborateurs, a démontré que l'activité de la kinase de TRPM7 est essentielle à la colonisation des tissus par les cellules T CD103⁺ des GALT (tissu lymphoïde du système digestif). Dans cette étude la kinase de TRPM7 modulerait la signalisation au TGF- β en phosphorylant Smad2 sur les résidus Sérine 465 et 467 situés en C-terminal [Romagnani *et al.* 2017].

La kinase de TRPM7 est également capable de phosphoryler la kinase eEF2 sur le résidu sérine 77. L'activation d'eEF2-K conduit à la phosphorylation inhibitrice du facteur eEF2 aboutissant à une inhibition de la translocation des protéines sur le ribosome [Perraud *et al.* 2011]. Le domaine kinase de TRPM7 est donc un régulateur de la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes (Figure 25).

La kinase de TRPM7 possède également comme substrat l'histone H3, qu'elle phosphoryle sur les résidus Sérine 10 et 28 et Thréonine 3 modifiant ainsi le processus de remodelage de la chromatine, affectant directement la transcription de l'ADN. Ce processus est permis par le clivage du canal et la circulation d' α -kinase libre dans les cellules. Loin d'être une exception, ce phénomène a été observé dans de nombreuses lignées cellulaires de même que sur tissus [Krapivinsky *et al.* 2014].

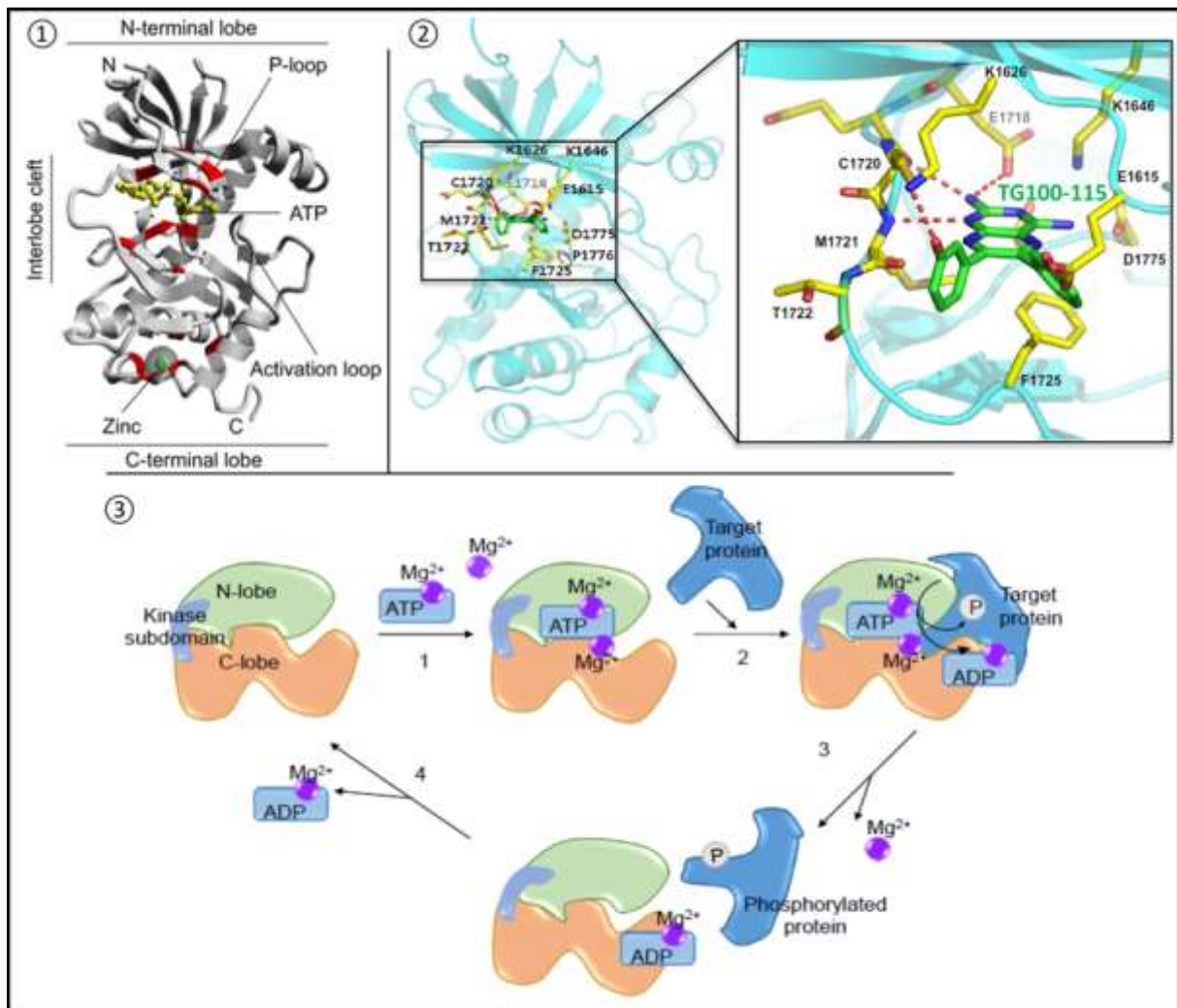


Figure 27) Structure du domaine kinase de TRPM7, interaction avec un inhibiteur et réaction catalytique dépendante du magnésium :

1) Structure 3D du domaine kinase de TRPM7 faisant apparaître le lobe C-ter avec le domaine de stabilisation par le zinc, le lobe N-terminal relié au canal, et la région interlobe où se situe le site catalytique dans lequel a lieu l'hydrolyse de l'ATP. 2) Représentation schématique de l'inhibition de l'activité catalytique de l' α -kinase par le TG100-115 ; les liaisons hydrogènes sont représentées en rouge pointillés, la molécule de TG100-115 apparaît en vert et les éléments composant le site catalytique en jaune. 3) Schémas représentant la phosphorylation d'une protéine cible par la kinase de TRPM7, le magnésium est nécessaire à la réaction enzymatique.

Modifié d'après [Middlebeek *et al.* 2010, Song *et al.* 2017 et Zou *et al.* 2019].

4) Interaction avec le canal TRPM6 :

Comme déjà évoqué, TRPM7 est en mesure de former des hétérotétramères avec TRPM6. Le canal TRPM7 apparaît comme le régulateur majeur de l'activité des hétérotétramères. Il a été démontré qu'une délétion de TRPM6 réduit le courant TRPM7/TRPM6 quand une délétion de TRPM7 l'inhibe totalement [Cai *et al.* 2017 ; Chubanov *et al.* 2016]. TRPM7 et TRPM6 possèdent tous deux de nombreux sites de phosphorylation identifiés. Cependant, il a été démontré qu'il existe un phénomène de phosphorylation de TRPM7 par le canal TRPM6 (Figure 28) [Chubanov *et al.* 2004].

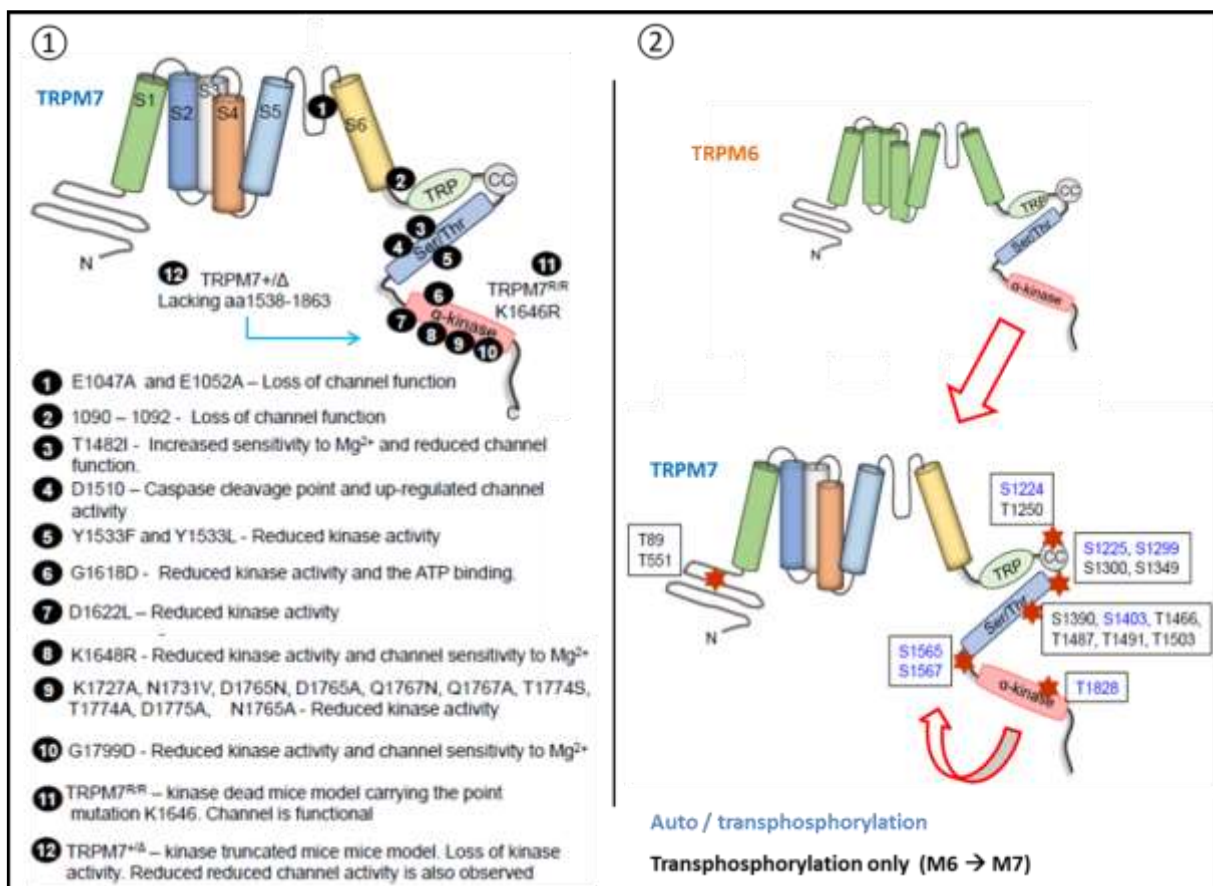


Figure 28) Représentation des sites de régulation de TRPM7 et des sites de phosphorylation du canal :

1) Localisation et effet des mutations de la séquence du canal TRPM7. Les mutations ont permis d'identifier le rôle des acides aminés sur le fonctionnement, la stabilité et la sensibilité du canal et du domaine kinase. 2) Sites de phosphorylation du canal TRM7. Les sites d'autophosphorylation du canal sont représentés en bleu, les sites de transphosphorylation par le canal TRPM6 en noir. Il est à noter que le canal TRPM6 peut également phosphoryler les zones d'autophosphorylation du canal TRPM7.

Modifié d'après [Zou *et al.* 2019].

Il a été montré qu'un canal TRPM7 sans domaine kinase présentait de nombreuses phosphorylations sur des résidus sérine et thréonine et que ces groupements disparaissaient après invalidation de TRPM6 [Chubanov *et al.* 2004].

Les conséquences physiologiques de ces mécanismes de régulation par auto/transphosphorylation restent à l'heure actuelle très peu connus. Il permettrait de réguler, respectivement, la sensibilité / activité du canal, et le maintien de l'hétérotétramère TRPM7/TRPM6 [Chubanov *et al.* 2004 ; Zou *et al.* 2019]. Le canal TRPM6 est le seul canal magnésique avec lequel TRPM7 interagit de façon directe.

IV) Systèmes de régulation de l'activité du canal TRPM7 :

1) Systèmes de régulation physiologiques :

Bien qu'étant constitutivement actif, le canal TRPM7 est soumis à de nombreux systèmes de régulation. Il est difficile d'évoquer les particularités électrophysiologiques du courant généré par TRPM7 sans mentionner sa régulation par le Mg^{2+} . En effet, le Mg^{2+} libre induit une inhibition dose-dépendante du courant MIC en régulant l'ouverture du canal (Figures 26 et 29) [Demeuse *et al.* 2006]. Il a également été démontré que lorsque le Mg^{2+} forme un complexe avec des nucléotides tri-phosphate (Mg-ATP, Mg-GTP etc.) l'effet inhibiteur induit sur la fonction canalaire est potentialisé. L'effet inhibiteur maximal étant généré par le Mg-ATP. La régulation de l'activité de TRPM7 par le magnésium libre ou lié à l'ATP est considérée comme un mécanisme de régulation passif et permanent. L'activité du canal TRPM7 pour des concentrations en magnésium et Mg-ATP intracellulaire physiologiques est estimée à seulement 10% de son activité maximale théorique [Penner *et al.* 2007].

L'intensité variable de l'inhibition du courant en fonction de la complexation ou non du Mg^{2+} à l'ATP est expliquée par la présence de deux sites distincts de régulation. En effet, le Mg^{2+} libre se fixe préférentiellement au niveau du pore du canal alors que le Mg-ATP possède un site de fixation privilégié situé sur le domaine kinase de TRPM7 ainsi qu'un site annexe situé sur le domaine CCR [Demeuse *et al.* 2006 ;

Jansen et al. 2016]. Le clivage de l' α -kinase par la caspase-8, abolit l'effet inhibiteur du Mg-ATP sur le canal et augmente l'intensité du courant entrant, confirmant le rôle régulateur du magnésium via le domaine kinase **[Desai et al. 2012]**.

Néanmoins, les effets régulateurs de la kinase sur le canal sont sujets à controverse et les conclusions des différentes équipes de recherches travaillant sur le sujet divergent. Alors que Runnels et collaborateurs suggèrent que le domaine kinase est absolument indispensable à la fonction canal, d'autres équipes suggèrent que les fonctions sont dissociées en enregistrant des courant MIC identiques dans les versions sauvage et tronquée de TRPM7 **[Matsushita et al. 2005 ; Schmitz et al. 2005]**.

Une autre hypothèse place la kinase de TRPM7 comme principale élément régulateur de la sensibilité du canal au Mg libre ou lié à l'ATP. En effet, le canal TRPM7 présenterait des propriétés d'autophosphorylation (Figures 28 et 29). Hermosura et collaborateurs ont démontré que la délétion du résidu thréonine 1428 du canal TRPM7, induisait une diminution de l'incorporation de phosphate par le chanzyme de 30% et potentialisait l'inhibition du courant MIC par le Mg^{2+} , suggérant que la kinase régule la sensibilité du canal au Mg^{2+} **[Hermosura et al. 2005]**.

Outre le rôle controversé du domaine kinase de TRPM7 sur la régulation de l'activité du canal, une publication récente propose que l'activité enzymatique du canal régule sa stabilité. En effet, Cai et collaborateurs ont démontré que des canaux TRPM7 mutés à différents endroit du domaine kinase sont plus facilement dégradés par le protéasome, et séquestrés dans des vésicules intracellulaires **[Cai et al. 2018]**. Les résidus Sérines 1360, 1403 et 1567 sont impliqués dans le mécanisme de « trafficking » du canal. **[Cai et al. 2018]**. Le domaine kinase semble donc réguler indirectement l'activité du canal en favorisant son adressage à la membrane et en empêchant sa dégradation.

Le magnésium n'est pas le seul élément régulateur de l'activité de TRPM7 celle-ci dépend également de paramètres environnementaux comme le pH. Il a été démontré que plus les valeurs de pH extracellulaire sont faibles plus l'activité du canal est importante, avec un courant entrant enregistré décuplé lorsque le pH extracellulaire atteint 4. A l'inverse, l'activité du canal TRPM7 est inhibée par un pH intracellulaire acide et activée par un pH cytosolique alcalin (Figure 29). **[Jiang et al. 2005 ; Chokshi et al. 2012]**

L'osmolarité est également un paramètre régulateur de la fonction canalaire de

TRPM7, il a été démontré que l'hyperosmolarité inhibe le courant MIC alors que l'hypotonosité l'active (Figure 29) [Bessac *et al.* 2007].

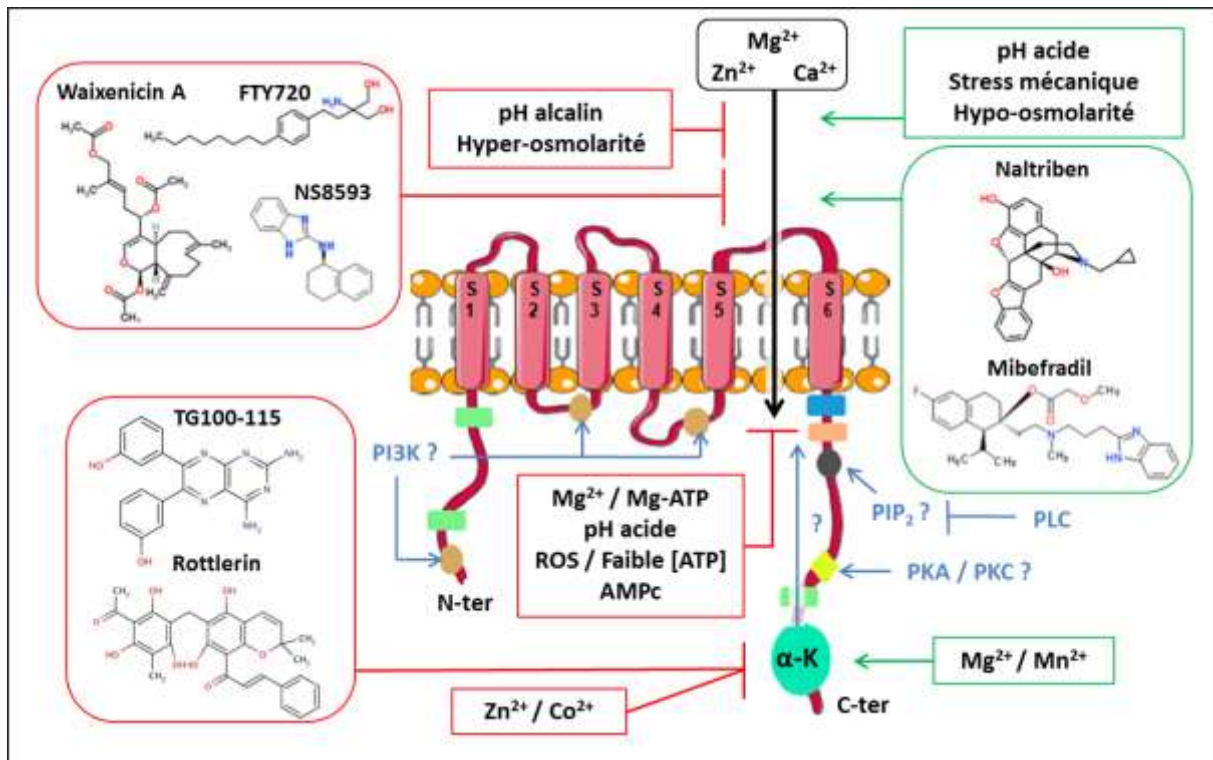


Figure 29) Systèmes de régulations physiologiques et pharmacologiques du canal TRPM7 :

Régulateurs physiologique et pharmacologique de TRPM7 : Les éléments inhibants l'activité de la protéine (canal ou kinase) sont représentés en rouge tandis que les éléments activateurs sont présentés en vert. Les modes de régulation controversés et/ou putatifs sont inscrits en bleu. Les principaux modulateurs pharmacologiques de TRPM7 sont représentés. Le domaine kinase de TRPM7 est annoté « α -K » et ses principaux inhibiteurs sont également représentés.

Créée d'après [Chubanov *et al.* 2014 et Hantute-Ghesquier, 2018].

Il existe également un système de régulation du canal TRPM7, passant par la stimulation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG). L'activité du canal est notamment connue pour être modulée par le PIP_2 [Runnels *et al.* 2002] et par l'AMPc [Takezawa *et al.* 2004]. La régulation de l'activité de TRPM7 par le PIP_2 n'est pas un cas isolé chez les TRPM car 5 de leurs membres (M3,4,5,7 et 8) possèdent des sites de liaisons au PIP_2 [Hantute-Ghesquier *et al.* 2018] et 4 d'entre eux sont régulés par cette molécule. [Nilius *et al.* 2006 ; Liu *et al.* 2003 ; Liu *et al.*

2005 ; Rohacs et al. 2005]. Le PIP2 régule négativement l'activité de TRPM7 suite à son hydrolyse par la PLC **[Runnels et al. 2002]**. Takezawa et collaborateurs ont démontrés que l'activité de TRPM7 est régulée positivement par de fortes concentrations d'AMPc intracellulaire et que cet effet est aboli par des antagonistes de la PKA.

2) Régulation par les Récepteurs Tyrosine Kinase :

L'activation de RTK tels que le VEGFR ou l'EGFR par un ligand induit la dimérisation du récepteur suivie du recrutement de protéines effectrices et de l'activation de cascade de signalisation en aval. Ces processus sont finement régulés par le magnésium intracellulaire.

L'hyperactivation des RTK suite à des mutations est une caractéristique du cancer, cela engendre la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Pour cette raison, des inhibiteurs de VEGFR et EGFR ont été utilisés comme traitements anti-prolifératifs dans certains cancers **[Izzedine et al. 2017]**. Ces traitements ont été associés à de nombreux effets secondaires délétères sur les patients tel que l'hypertension, une cardio et une réno-toxicité accompagnées de désordres électrolytiques **[Fakih et al. 2010 ; Izzedine et al. 2017]**. Parmi les anomalies électrolytiques majeures induites par les inhibiteurs de RTK, on retrouve une perte importante du magnésium rénal accompagné d'hypomagnésémie **[Cosmai et al. 2015]**.

Il a été démontré que ce phénomène est lié à un dysfonctionnement de TRPM6 dans les reins. Lorsque l'EGF se fixe à son récepteur il y a induction de la translocation de TRPM6 à la membrane **[Thebault et al. 2009]**. Ce processus est inhibé par l'utilisation de cetuximab, un anticorps bloquant l'EGFR **[Thebault et al. 2009 ; Groenestege et al. 2007]** La diminution de l'activité de TRPM6 (séquestré dans le cytosol) suite au traitement au cetuximab réduit l'influx magnésique intracellulaire, favorise l'excrétion du magnésium par le glomérule et génère l'hypomagnésémie.

A l'instar de son homologue TRPM6, le canal TRPM7 est également régulé par des RTK, notamment par l'EGFR et le VEGFR (Figure 7) **[Hong et al. 2005 ; Runnels et al. 2002]** Les effets de l'activation des RTK sur TRPM7 diffèrent beaucoup en fonction des modèles d'études. Ainsi, alors que l'activation de l'EGFR engendre une

inhibition de l'activité de TRPM7 impliquant le PIP2 et la PLC dans les cellules ovariennes [Runnels *et al.* 2002] celle-ci engendre une diminution de l'activité de TRPM7 accompagné d'une inhibition de la migration des cellules cancéreuses pulmonaires [Gao *et al.* 2011]. L'activation de TrkA (Tropomyosin récepteur kinase A) par le NGF (Nerve Growth Factor) réduit le courant rectifiant sortant de TRPM7 et cet effet est endigué par des inhibiteurs de TrkA et de la PLC [Tian *et al.* 2007]. Dans le modèle des CSH il a été montré qu'une stimulation au PDGF accroît l'expression de TRPM7. Le traitement au 2-APB diminue l'activation de la voie de signalisation dépendante du RTK au PDGF influençant l'activité de TRPM7.

Ces effets semblent être relatifs à des changements de la concentration intracellulaire de magnésium, lorsque celle-ci est faible la PLC favorise l'inhibition de TRPM7 alors qu'en présence de concentrations magnésiques élevées l'activation de la PLC augmente le courant MIC [Langeslag *et al.* 2007]. Dans les cellules de prostate l'expression de TRPM7 est régulée par la voie ERK, car l'inhibition de ERK réduit l'expression de TRPM7 [Sun *et al.* 2014]. L'angiotensine II augmente également l'expression du canal TRPM7 via le récepteur AT1 et ERK [Zhang *et al.* 2012]. La bradykinine, un autre peptide vasoactif, régule également l'expression de TRPM7 ainsi que sa cible, l'annexine A1, via la PLC et Src. Cette voie de régulation de TRPM7 permet le maintien de l'homéostasie magnésique et des phénotypes migratoires et invasifs des CMLV. [Callera *et al.* 2009] l'IL-18 active également le courant MIC et régule positivement l'expression des CMLV via ERK1/2 [Zhang *et al.* 2017].

3) Modulateurs Pharmacologiques de TRPM7 :

A) Modulateurs de la fonction canal :

Au-delà des systèmes de régulation physiologiques de TRPM7, il est possible d'influencer expérimentalement l'activité de ce canal *via* des modulateurs pharmacologiques (Figure 29).

Relativement peu de molécules permettant de cibler le canal TRPM7 ainsi que les TRP en générale [Chen *et al.* 2010]. Parmi ces inhibiteurs on compte le 2-APB,

testé sur de nombreux modèles cellulaires, il permet notamment de moduler la prolifération dépendante de TRPM7 [Leng et al. 2017] mais cible également l'ensemble des canaux TRP [Haugaard et al. 2015]. Néanmoins, Chokshi et collaborateurs ont démontré que l'inhibition du canal TRPM7 par le 2-APB peut être levée par l'ajout d'HEPES. Ils suggèrent que le 2-APB puisse ne pas inhiber directement le canal TRPM7 mais moduler son activité en acidifiant le pH cytosolique [Chokshi et al. 2012].

D'autres inhibiteurs comme le carvacrol sont des bloqueur de certains TRP [Parnas et al. 2009], et le xyloketal B atteint les canaux SOC [Zhao et al. 2018]. Néanmoins, des études montrent que le xyloketal B inhibe le courant MIC et la migration dépendante de TRPM7 dans les HEK 293 [Chen et al. 2015b].

Il existe également des inhibiteurs de TRPM7 de meilleure spécificité, tel que le FTY720, permettant notamment d'inhiber la prolifération et la migration dépendantes de TRPM7, sur cellules HEK 293 avec une valeur d'IC₅₀ très faible (0.7 µM) [Qin et al. 2013]. De la même façon, la Waixenicin A, isolé à partir de coraux *Sarcothelia edmonsoni*, inhibe la prolifération, la migration et l'invasion TRPM7-dépendante dans les cellules cancéreuses gastriques et mammaires [Kim et al. 2013]. L'inhibition par la Waixenicin A est potentialisée par le Mg²⁺ intracellulaire et s'effectue pour une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire [Middlebeek et al. 2015].

Malgré son manque de spécificité, puisque il inhibe également les canaux potassiques calcium-dépendants de faible conductance (SK_{Ca}) K_{Ca}2.1 et 2.3, le NS8593, est l'un des inhibiteurs de TRPM7 les plus utilisés dans la littérature (Figure 29). Le NS8593 est un inhibiteur du pore du canal TRPM7, il bloque le passage des cations en se fixant entre les segments S5 et S6. L'inhibition par le NS8593 est réversible, l'activité du canal est restaurée lorsque l'inhibiteur est enlevé [Shen et al. 2014]. De plus, l'effet inhibiteur du NS8593 varie en fonction de la concentration magnésique intracellulaire, en effet, l'IC₅₀ du NS8593 est de 1.6 µM pour une concentration de magnésium proche de zéro contre 5.9 µM pour une concentration magnésique intracellulaire de 300 µM [Shen et al. 2014]. Cet inhibiteur permet notamment de bloquer la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) dépendante de TRPM7 dans les cellules cancéreuses mammaires et a été testé à des concentrations de 10, 20 et 30 µM [Davis et al. 2014]. Il existe également deux molécules connues à ce jour pour exercer un effet activateur sur le canal TRPM7 : le

Naltriben et le Mibefradil. Malheureusement, les études réalisées sur ces molécules sont peu nombreuses (Figure 29) [Wong *et al.* 2017 ; Schafer *et al.* 2016].

B) Modulateurs de la kinase :

Concernant l'inhibition de l'activité kinase de TRPM7 il existe 3 principaux inhibiteurs : la rottlerin, le NH125 et le TG100-115 (Figure 29). La rottlerin, composé issue de *Mallotus Philippinensis*, est un inhibiteur bien connu de la PKC δ , néanmoins il a été démontré que cette molécule inhibe également la kinase de TRPM7 avec une IC₅₀ de 35 μ M [Ryazanova *et al.* 2004]. Malheureusement le pouvoir inhibiteur de la rottlerin sur la kinase de TRPM7 est bien faible comparé à celui qu'elle exerce sur les différentes isoformes de PKC et notamment sur la PKC δ (IC₅₀ comprise entre 3 et 6 μ M) [Gschwendt *et al.* 1994]. Le NH125, un inhibiteur de eEF-2 (eucaryotic elongation factor 2 kinase), inhibe quant à lui la kinase de TRPM7 avec une valeur d'IC₅₀ de 55 μ M [Devkota *et al.* 2012] traduisant également un pouvoir inhibiteur faible.

Il apparaît nécessaire de travailler avec des outils pharmacologiques plus spécifiques de la kinase de TRPM7. Song et collaborateurs ont mis en évidence un nouvel inhibiteur présentant une affinité pour l' α -kinase de TRPM7 70 fois supérieure à celle de la rottlerin. [Song *et al.* 2017] Avec une IC₅₀ de 2 μ M le TG100-115 paraît être un inhibiteur de premier choix pour cibler le domaine kinase de TRPM7. Malheureusement celui-ci réduit également le courant MIC lorsqu'il est utilisé à forte dose (50 et 100 μ M), suggérant qu'il puisse agir sur le canal TRPM7 indépendamment de son action sur le domaine kinase du chanzyme [Song *et al.* 2017].

V) Rôle Physiologique de TRPM7 :

TRPM7, de par son rôle dans la régulation de l'homéostasie magnésique intracellulaire, influence un grand nombre de processus physiologiques indispensables. Il est notamment impliqué dans la régulation de la gastrulation des

vertébrés [liu et al. 2011], indispensable au développement embryonnaire [Ryazanova et al. 2010], et régule la prolifération, la survie et la migration cellulaires.

1) TRPM7, développement embryonnaire et différenciation :

L'expression du canal TRPM7 est indispensable au développement embryonnaire. [Jin et al. 2012] Celui-ci influence différents niveaux de développement et permet la mise en place de nombreux organes et tissus. [Romani et al. 2011 ; Nadolni et al. 2018 ; Gao et al. 2011]. TRPM7 est d'ailleurs indispensable à la mise en place du thymus, [Nadolni et al. 2018] du tissu osseux [Xiao et al. 2015 ; Yee et al. 2014] du pancréas [Sun et al. 2014] du tissu adipeux [Park et al. 2014] ainsi que du myocarde [Sah et al. 2013]. Des études menées sur modèle murin permettent de préciser que TRPM7 intervient dans les phases précoces du développement embryonnaire, une délétion du canal est létale après la première semaine de développement mais n'entraîne aucune conséquence après 14 jours. [Gao et al. 2011]. Néanmoins il est indispensable à la cardiogenèse précoce comme tardive (j12) [Sah et al. 2013]. Il a également été montré qu'il est indispensable à la maturation des thymocytes en lymphocytes T [Nadolni et al. 2018] De plus, l'inhibition de TRPM7 empêche la gastrulation des ovocytes de xenopes en bloquant la migration polarisée des cellules embryonnaires [DeBaaij et al. 2015]. TRPM7 contrôle également la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en régulant l'homéostasie calcique, ce qui influence la différenciation cellulaire, le processus de régénération tissulaire autant que la génération de métastases et la migration des cellules cancéreuses. Il a été démontré que le courant MIC est plus important dans les cellules de carcinome hépatique que dans les cellules de foie en différenciation, suggérant une corrélation direct entre l'activité de TRPM7 et la différenciation cellulaire. [Deason-Towne et al. 2011 ; Inoue et al. 2009]

2) TRPM7 et cytosquelette :

Le canal TRPM7 est également impliqué dans l'acquisition et le maintien de la morphologie cellulaire ainsi que dans la dynamique de réorganisation du cytosquelette.

Il a été démontré que moduler l'expression de TRPM7 engendre des variations de l'adhésion et des modifications de la morphologie cellulaire **[Montell et al. 2003 ; Krapivinsky et al. 2014 ; Chandra et al. 2016]**.

Le canal TRPM7 module également le cytosquelette, la migration et la morphologie cellulaire via les substrats de l' α -kinase : la myosine-IIa et la tropomodulin 1 (cf. partie : Le domaine kinase de TRPM7) **[Dorovkov et al. 2008 ; Ryazanova et al. 2004 ; Guilbert et al. 2013 ; Clark et al. 2008 ; Zhao et al. 2015]**.

De nombreuses études ont permis de conclure que TRPM7 régule la migration, l'adhésion et le cytosquelette en générale à la fois en tant que canal et *via* son activité enzymatique. En effet, il a été reporté que le canal TRPM7 régule la contractilité de l'actomyosine et la formation de podosomes via un influx calcique mais également en phosphorylant la MHCII (Myosine Heavy Chain II) **[Krapivinsky et al. 2014 ; Liu et al. 2014]** TRPM7 joue également un rôle important dans l'assemblage du cytosquelette et dans la motilité des fibroblastes en régulant l'influx magnésique. **[Chandra et al. 2016]**. Le niveau d'expression du canal TRPM7 est positivement corrélé à la migration dans de nombreux types cellulaires, comme les CMLV, fibroblastes et lymphocytes-T **[DeBaaij et al. 2015 ; Chandra et al. 2016 ; Lee et al. 2011]**.

TRPM7 permet la mise en place de microdomaines riches en calcium au niveau des lamellipodes permettant la migration des fibroblastes et régulant probablement la force de traction **[Lee et al. 2011]** D'autres part de nombreuses études démontrent que la migration cellulaire est majoritairement régulée par le magnésium, présenté comme un régulateur de la voie Rho-Rho kinase **[DeBaaij et al. 2015 ; Chandra et al. 2016]**. De façon similaire, dans le modèle de l'ACP, TRPM7 a été identifié comme un régulateur de la migration cellulaire magnésium-dépendante **[Rybarczyk et al. 2012]**.

3) TRPM7 et survie cellulaire :

Plusieurs études se sont focalisées sur le rôle de TRPM7 dans la survie cellulaire. TRPM7 joue notamment un rôle protecteur dans la survie des CSH (cellules stellaires hépatiques) en régulant négativement l'activation de la voie TRAIL appartenant au phénomène d'apoptose par la voie extrinsèque, ainsi que l'apoptose dépendante du réticulum (stress réticulaire) [Liu et al. 2012 ; Zhu et al. 2014]. L'extinction du canal TRPM7 dans un modèle cellulaire de cancer de la vessie engendre une augmentation de la production de ROS causant l'apoptose [Cao et al. 2016]. Le rôle anti-apoptotique de TRPM7 est également retrouvé sur des cellules cancéreuses de la prostate. Dans ce modèle, l'extinction du canal TRPM7 provoque une augmentation de l'expression des récepteurs de mort DR4 et 5 (Death Receptor 4 et 5) couplée à une élévation de la caspase-3 clivée [Lin et al. 2015].

Le canal TRPM7 exerce également un effet protecteur sur l'apoptose des cellules de cancer gastrique *via* une régulation de l'activité de la caspase-3 [Kim et al. 2008].

Néanmoins, d'autres études pharmacologiques portant sur l'induction de l'apoptose par divers extraits végétaux aux propriétés anti-cancéreuses démontrent un effet positif du canal TRPM7 sur l'apoptose. Les résultats démontrent que tous les composés anti-cancéreux testés (Ginsenoside, Sophorae Radix et Quercetin) augmentent l'apoptose des cellules de cancer gastrique uniquement lorsque TRPM7 est exprimé. L'inhibition et/ou l'inactivation du canal réduisent l'apoptose induite par les composés anti-cancéreux, alors que la sur-expression du canalyne la potentialise l'effet apoptotique [Kim et al. 2011 ; Kim et al. 2012 ; Kim et al. 2014].

La fonction kinase de TRPM7 a également un impact sur la survie cellulaire. Il a été rapporté qu'en condition pro-apoptotique, le clivage de la kinase par la caspase-8 induit l'activation de la voie pro-apoptotique Fas dans les cellules T [Desai et al. 2012]. La kinase de TRPM7 influence également l'apoptose en régulant l'adressage nucléaire de l'annexin-A1 transitant via la Myosine IIA dans la cellule neuronale [Zhao et al. 2015]

A l'inverse de rares études montrent le canal TRPM7 comme un inducteur de l'apoptose cellulaire. Ainsi, il a été démontré que l'inactivation de TRPM7 a un effet

protecteur sur l'apoptose induite par le LPS (Lipo-PolySaccharide) sur les cellules PC-12 (lignée neuroblastique) [Nunez-Villena *et al.* 2011]. L'inhibition de TRPM7 augmente la résistance des cellules fibroblastiques aux agents inducteurs de l'apoptose tels que la doxorubicine ou la staurosporine. L'effet anti-apoptotique est accompagné d'une diminution du magnésium cytosolique, des ROS et de l'activation de PARP ainsi que de la caspase 3 [Chen *et al.* 2012].

Enfin, il semblerait que le canal TRPM7 soit également impliqué dans d'autres mécanismes de mort cellulaire. Ainsi, TRPM7 exerce un effet protecteur sur la nécrose via un influx magnésique, en permettant la dégradation des métabolites toxiques dans les mélanocytes [McNeill *et al.* 2007]. Il est également impliqué dans la protection des neurones face au stress oxydant dans des études sur l'hypoxie cérébrale [Aarts *et al.* 2003] et est impliqué dans la régulation de l'autophagie dans les cellules embryonnaires rénales [Oh *et al.* 2015].

4) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération cellulaire :

Il a été démontré que la prolifération cellulaire est intimement liée à l'expression de TRPM7 puisque ce mécanisme est aboli sur des clones n'exprimant plus TRPM7 [Runnels *et al.* 2001 ; Schmitz *et al.* 2003]. L'arrêt de la prolifération semble être induit par la dérégulation de l'homéostasie magnésique (finement régulée par TRPM7) puisqu'une supplémentation magnésique permet de réamorcer la prolifération cellulaire [Schmitz *et al.* 2003]. TRPM7 est un élément central de la régulation magnésique et calcique, son inhibition engendre une diminution des entrées de Ca^{2+} et Mg^{2+} . De manière intéressante, lorsque les concentrations extracellulaires de Ca^{2+} et Mg^{2+} diminuent, l'expression du canal TRPM7 augmente, suggérant l'existence de mécanisme de compensation impliquant TRPM7 [Abed *et al.* 2007]. Yee et collaborateurs, ont démontré que le canal TRPM7 régule la prolifération cellulaire par une voie magnésium dépendante lors du développement pancréatique sur le modèle du poisson zèbre. [Yee *et al.* 2011].

L'inhibition de TRPM7 via des inhibiteurs pharmacologiques ou par invalidation stable, aboutit à une diminution de la prolifération des lymphocytes T [Zierler *et al.* 2011]. Le mécanisme prolifératif a été identifié comme étant magnésium dépendant

puisque une supplémentation magnésique permet de rétablir la prolifération cellulaire au niveau contrôle. De façon similaire, la prolifération cellulaire est restaurée dans les clones présentant une délétion du domaine kinase **[Sahni et al. 2008]**.

Le lien associant TRPM7, la prolifération ainsi que le magnésium est confirmé dans de nombreux modèles cellulaires. L'angiogenèse, via la prolifération des cellules endothéliales, est également altérée par une inhibition du canal TRPM7. Un blocage du cycle cellulaire similaire est observé pour les cellules cultivées dans des concentrations magnésique extracellulaires faibles (0,1 mM) **[Baldoli et al. 2012]**.

Néanmoins, dans le cas d'une inhibition du canal TRPM7, il existe des mécanismes de compensation magnésique passant par SLC41A1 **[Mandt et al. 2011]**, SLC41A2 **[Sahni et al. 2007]** et MagT1 **[Deason-Towne et al. 2011]**.

Il a été démontré que la prolifération cellulaire induite par l'IL-4 dans les Macrophages M2 est également dépendante de TRPM7 **[Schilling et al. 2014]**.

Dans les cellules HUVEC, TRPM7 favorise l'entrée cationique ainsi que la prolifération cellulaire via l'activation de la voie ERK **[Inoue et al. 2009]**. La prolifération cellulaire est d'ailleurs un processus étroitement lié à l'entrée cationique. L'implication de TRPM7 dans la progression du cycle cellulaire a également été démontrée sur les mastocytes. Dans ce modèle cellulaire, la prolifération est permise par l'association des courants I_{ARC} (courant calcique sensible à l'acide arachidonique) et MIC **[Tani et al. 2007]**.

Le canal TRPM7 favorise également la prolifération des CMLV via la voie ERK en condition de stress oxydant **[Yang et al. 2017]**. TRPM7 régule également la prolifération cellulaire des CSH en réponse au PDGF-BB via l'activation des voies PI3K et ERK **[Fang et al. 2013]**.

De plus, il a été démontré que le canal est indispensable à la prolifération des adipocytes induite par l'angiotensine II **[Che et al. 2014]**. Le canal régule la prolifération cellulaire des préadipocytes en permettant la synthèse de cyclines D et E et en activant la voie ERK1/2 **[Che et al. 2014]**. La régulation de la progression dans le cycle cellulaire via ERK1/2 par TRPM7 a également été démontrée sur modèle de cellules endothéliales microvasculaire et ombilicale. Cet effet influence systématiquement la phase G0/G1 du cycle cellulaire et implique le magnésium **[Baldoli et al. 2012 ; Inoue et al. 2009]**.

L'ensemble des données bibliographiques traduisent le rôle de premier plan joué par le canal TRPM7 dans le processus de prolifération cellulaire. Celui-ci régule ce phénomène majoritairement via sa fonction canal et en interagissant avec les acteurs de la signalisation intracellulaire.

5) Régulation des voies de signalisation intracellulaires par TRPM7 :

Les RTK et leurs ligands participent activement à la régulation de TRPM7 mais constituent également des cibles dont il peut moduler l'activité (Figure 30). TRPM7 est notamment connu pour réguler l'activation des MAPK. Il a été montré que l'invalidation de TRPM7 par siRNA dans les cellules endothéliales humaines est associée à une diminution de la phosphorylation de ERK1/2, sans impacter JNK ni p38 MAPK [Lin *et al.* 2016]. A l'inverse, la surexpression de TRPM7 dans les HEK293 réduit la phosphorylation de ERK1/2 et augmente l'activation de p38 MAPK et JNK [Liu *et al.* 2014]. Les cibles régulées par TRPM7 dans les voies de signalisation semblent donc varier en fonction du type cellulaire.

Dans les CSH de rat, la surexpression de TRPM7 favorise l'activation des voies ERK1/2 et AKT induite par le PDGF [Fang *et al.* 2013]. De la même façon l'invalidation de TRPM7 induit une réduction de l'expression de la forme phosphorylée de ERK1/2 dans les CMLV [Zeng *et al.* 2015 ; Su *et al.* 2010]. L'utilisation d'un siTRPM7 réduit également l'activation de Src, p38 MAPK, ERK1/2 et JNK dans les cellules cancéreuses mammaires [Davis *et al.* 2014 ; Meng *et al.* 2013].

L'activation pharmacologique de TRPM7 par le naltriben augmente également la phosphorylation de ERK1/2 ainsi que la prolifération des cellules de glioblastome sans affecter la voie PI3K/Akt [Yee *et al.* 2011]. Plusieurs études montrent que l'inhibition pharmacologique de TRPM7 médié par le carvacrol induit une suppression de la phosphorylation de ERK1/2 et AKT et réduit la prolifération cellulaire [Luo *et al.* 2016 ; Wong *et al.* 2017]. Néanmoins, le carvacrol et le naltriben n'étant pas

spécifiques du canal TRPM7 ces résultats doivent être considérés avec précaution en attente d'une confirmation avec des outils plus spécifiques (siRNA, plasmides vecteurs).

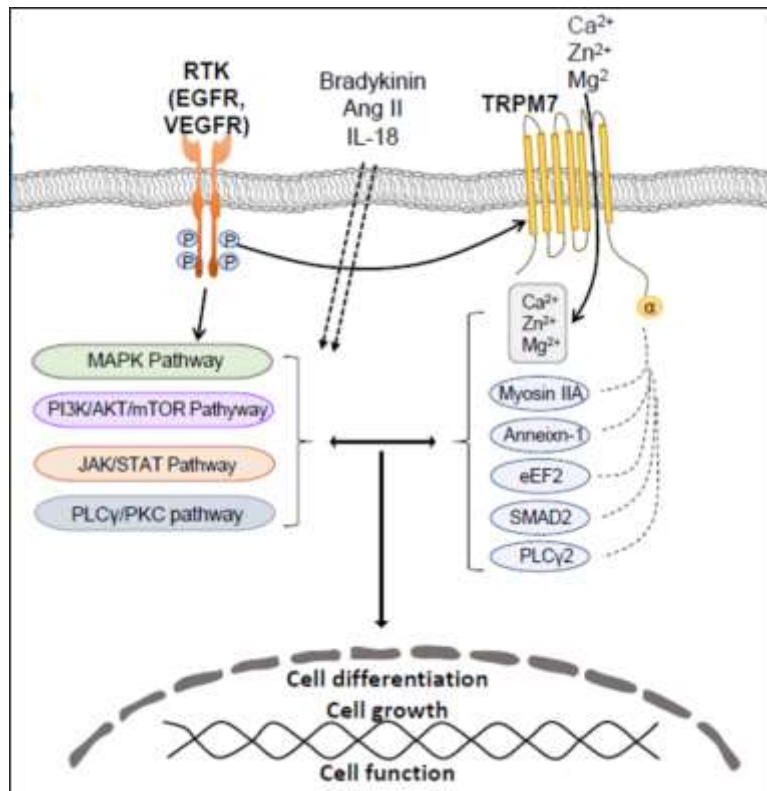


Figure 30 Interaction entre le canal TRPM7 et les voies de signalisation intracellulaires des RTK :

Représentation schématique de l'interaction entre le canal TRPM7 et les voies de signalisations dépendantes de facteurs de croissances. Les RTK et leurs ligands régulent l'activité et l'impact du canal TRPM7 sur les grandes fonctions physiologiques. En retour, le canal TRPM7 régule l'activation des RTK et module les voies de signalisation intracellulaires qui en découlent. Les flèches en pointillés représentent les signalisations régulant TRPM7 et activant les voies de signalisations indépendamment des RTK.

Modifié d'après [Zou *et al.* 2019].

A l'instar de la voie des MAPK, la voie PI3K/Akt est également régulée par le canal TRPM7. Une étude menée sur des chondrocytes murins montre que la surexpression de TRPM7 stimule la voie AKT alors que l'extinction du canal l'inhibe [Lu *et al.* 2017]. Dans les ostéoblastes les effets génomiques induits par une augmentation du magnésium intracellulaire sont inhibés à la fois par un siTRPM7 et par une inhibition de PI3K, suggérant une interaction entre les deux partenaires. [Liu

et al. 2014] Il a également été démontré, par une double approche d'inhibition pharmacologique et d'inactivation par siRNA, que TRPM7 régule la prolifération cellulaire *via* ERK1/2 et PI3K **[Fang et al. 2013]** Dans cette étude, le 2-APB, de même que le siTRPM7 modulent les effets du PDGF-BB sur les protéines du cycle cellulaire PCNA, Cycline D1 et CDK4 **[Fang et al. 2013]**.

L'expression de TRPM7 est également liée à l'activation de la voie Notch impliquée dans l'angiogenèse et dans la croissance tumorale induite par le VEGFR et l'EGFR **[Saltarella et al. 2019 ; Wang et al. 2015]** L'activation de STAT3, et la phosphorylation de Src, impliquées dans la migration médiée par l'EGF, sont également réduites lorsque TRPM7 est invalidé **[Davis et al. 2014 ; Meng et al. 2013]** TRPM7 est également impliqué dans la TEM des cellules cancéreuses ovariennes en régulant la voie PI3K/AKT **[Liu et al. 2019]**.

Il existe un lien important entre le canal TRPM7 est la signalisation intracellulaire dépendante des facteurs de croissance (Figure 30). Le canal TRPM7 est étroitement lié à la régulation des grands processus cellulaires, et tout dérèglement de son niveau d'expression ou de son activité engendre de graves conséquences sur l'homéostasie cellulaires.

VI) Implication de TRPM7 dans la pathologie :

1) TRPM7 et cancer :

De par leur importance dans le maintien de l'équilibre ionique nécessaire aux grandes fonctions cellulaires, les canaux ioniques et leur dérégulation impactent directement le cancer **[Prevarskaya et al. 2010]**.

Le gène codant pour TRPM7 est surexprimé dans de très nombreux cancers, une expression aberrante du chanzyme a été mise en évidence dans les cancers gastrique, ovarien **[Zhao et al. 2015]** le cancer du sein **[Zhao et al. 2015 ; Nunez-Villena et al. 2011]** et le cancer colorectal **[Castiglioni et al. 2015]**.

L'expression de TRPM7 est également anormalement importante dans l'adénocarcinome pulmonaire, de même que les cellules de rétinoblastomes et

glioblastomes [Sahni *et al.* 2010 ; Chen *et al.* 2015a ; Chen *et al.* 2015b ; Leng *et al.* 2015] De nombreuses études effectuées à la fois *in vitro* et sur tissus humains confirment que le canyzyne TRPM7 est sur-exprimé dans les cancers. Ainsi on retrouve une sur-expression de TRPM7 dans les cancers cérébraux (glioblastomes, astrocytomes), des voies aéro-digestives supérieures (carcinomes naso et oropharyngés, carcinomes buccaux) du sein (ductal, lobulaire, invasif), dans le cancer colorectal, de la prostate, dans les tumeurs liquides (lymphomes, myélomes) et dans l'ACP [Jin *et al.* 2008 ; Jin *et al.* 2012].

D'autres part, les études démontrant une sous-expression de TRPM7 dans le cancer restent limitées en nombres, et à 3 types histologiques : le cancer du col de l'utérus, de la vessie, et du rein [Jin *et al.* 2008 ; Jin *et al.* 2012].

L'expression du canal TRPM7 est de plus corrélée à de nombreux paramètres cliniques liés au cancer. Son niveau d'expression est, par exemple, inversement corrélé à la survie des patients dans les cancers ovariens et nasopharynx [Chen *et al.* 2014 ; Wang *et al.* 2014].

Il existe également une corrélation (positive) entre le niveau d'expression de TRPM7 et le nombre de métastase lymphatique, l'agressivité du cancer ou encore le grade de la tumeur dans le cancer nasopharyngé [Chen *et al.* 2014]. C'est également le cas de l'ACP, pour lequel une corrélation avec le grade de la tumeur et avec le taux de survie des patients sont observées [Rybarczyk *et al.* 2012]. Toujours dans l'ACP, l'expression de TRPM7 est non seulement associée au grade, mais également à la taille de la tumeur primaire et dans les cancers métastatiques [Xiao *et al.* 2015] Il est surexprimé dans le cancer du sein ER⁺ (exprimant le récepteur aux oestrogènes) et corrélé aux paramètres cliniques tels que le Ki67 ou la présence de métastases ganglionnaires dans le cancer du sein ER⁻ [Su *et al.* 2011 ; Davis *et al.* 2014]

2) TRPM7 dans les cellules stellaires :

La découverte récente du rôle primordial joué par les cellules stellaires dans le développement des cancers hépatique et pancréatique explique le manque de référence concernant le rôle de TRPM7 dans les modèles cellulaires de CSP et CSH.

La majeure partie des travaux concernant le rôle des canaux ioniques dans l'ACP concerne les cellules cancéreuses et ne portent pas sur l'étude des cellules stromales (CSP, CAF, cellules endothéliales etc.).

Il n'existe malheureusement aucune référence à propos du rôle du canal TRPM7 dans le fonctionnement des CSP. Néanmoins, il existe des travaux concernant le rôle du canal TRPM7 dans la survie, la prolifération ainsi que la sécrétion de cytokine par les CSH.

L'inhibition de TRPM7 induit notamment l'apoptose des CSH par la voie du stress réticulaire avec une augmentation de l'expression de BiP (Binding immunoglobuline Protein), CHOP (C/EBP HOmologous Protein) et de la caspase-12. **[Zhu et al. 2013]**

Le canal est également impliqué dans l'apoptose des CSH par la voie extrinsèque impliquant l'activation de TRAIL par le TNF- α **[Liu et al. 2012]**. Toujours dans le modèle des CSH, il a été démontré que le niveau d'expression de TRPM7 augmente suite à un traitement au PDGF-BB. L'inhibition au 2-APB ou l'invalidation avec un siTRPM7 engendre une diminution de la prolifération des CSH et influence le niveau d'expression de PCNA, CDK4 et cycline D1. L'expression des marqueurs d'activations α -SMA et Collagène de type I par les CSH diminuent avec l'inhibition de TRPM7 de même que l'activation des voies ERK et Akt. **[Fang et al. 2013]**

Fang et collaborateurs ont également démontré que l'expression du canal TRPM7 augmente de façon très importante dans le cadre de la fibrose hépatique. L'expression du canal TRPM7 augmente également lorsque les cellules sont traitées avec le TGF- β 1. De plus, l'inhibition du canal TRPM7 diminue l'expression des marqueurs d'activation α -SMA et Collagène de type I, de même que le niveau de phosphorylation de Smad2 et 3 induit par le TGF- β 1 **[Fang et al. 2014]**.

Les données bibliographiques récentes nous indiquent que le canal TRPM7 est impliqué dans la survie, la prolifération et la sécrétion des composants de la MEC dans les CSH. Le canal interagit étroitement avec les voies Akt, ERK et Smad dans ce modèle cellulaire.

En dépit de l'absence de résultats concernant TRPM7 sur les CSP, il existe des études, principalement conduites par Schwab et collaborateur, sur le rôle des canaux TRP dans les CSP. Néanmoins, la majorité de ces études s'intéressent à la migration des CSP et à l'activation du stroma. **[Zhang et al. 2013 ; Fels et al. 2016 ; Nielsen et al. 2017 ; Storck et al. 2017]**.

Ainsi, il a été démontré que les canaux TRPC3 et KCa3.1 présentent un couplage fonctionnel favorisant la migration cellulaire dans les CSP activées. L'inactivation de KCa3.1 engendre une diminution de la concentration calcique intracellulaire accompagnée d'une baisse de l'activité de la calpaïne et de la migration des CSP. Cette étude démontre par ailleurs que TRPC3 est surexprimé dans le stroma tumoral **[Storck et al. 2017]**.

La migration des CSP potentialisée par l'hypoxie est dépendante du canal TRPC6. Les clones dépourvus de canal TRPC6 échouent à migrer en réponse à l'hypoxie et présentent une concentration calcique cytosolique moins importante que dans les CSP contrôles **[Nielsen et al. 2017]** Il a également été démontré, sur les CSP, que le canal mécanosenseur TRPC1 est impliqué dans la migration cellulaire en réponse à la pression physique induite par le stroma tumoral. **[Fels et al. 2016]**

L'expression de TRPV4 augmente dans les CSP activées suite à un traitement à l'éthanol ou aux acides gras saturés. L'augmentation de l'expression de TRPV4 induit une élévation de la concentration calcique intracellulaire dans les CSP traitées et favorise la fibrose tissulaire **[Zhang et al. 2013]**.

OBJECTIFS

Objectif de l'étude :

L'ACP est un des cancers les plus mortels à l'échelle mondiale, la progression rapide et l'extrême agressivité qui le caractérisent sont étroitement liées au développement d'un stroma tumoral fibreux hautement réactif. **[Hidalgo et al. 2010]**

Le MET, composé en majorité de CSP favorise grandement le développement de l'ACP *via* la mise en place d'une étroite communication entre CSP et cellules d'ACP **[Vonlaufen et al. 2008b]** Les CSP, activées dans le cadre du cancer, sont les principales représentantes cellulaires du stroma tumoral. Elles favorisent la progression et la mobilité tumorale *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire et autres facteurs fibrogènes, mais également en remodelant activement la MEC. De plus, les CSP, de par les capacités prolifératives élevées qu'elles acquièrent durant l'activation, confèrent à la tumeur une protection physique importante contre les thérapies et acteurs de l'immunité anti-tumorale. **[Farran et al. 2019 ; Allam et al. 2017]**

De nombreuses études démontrent le rôle joué par les CSP dans le développement, la progression cancéreuse et la dispersion métastatique. Les effets exercés par les CSP sur la tumeur, sont principalement dû à leur pouvoir prolifératif important permettant aux CSP de supplanter en nombre tout autre type cellulaire dans le MET. **[Farran et al. 2019 ; Allam et al. 2017 ; Masamune et al. 2010]**

Le rôle primordial du Mg^{2+} dans la biologie de la cellule fait aujourd'hui consensus. Il a été démontré que le cation divalent le plus abondant dans la cellule, est indispensable à la prolifération cellulaire. **[DeBaaij et al. 2015 ; Romani et al. 2011]**

La régulation de l'homéostasie magnésique est indispensable à l'équilibre cellulaire et sa dérégulation engendre de nombreuses pathologies **[Castiglioni et al. 2011]**. La consommation magnésique quotidienne est d'ailleurs corrélée à l'incidence de cancers coloréctal, de l'œsophage, du foie ou encore à l'ACP. **[Folsom et al. 2006 ; Larsson et al. 2005 ; Van den Brandt et al. 2007 ; Yang et al. 2002 ; Tukiendorf et al. 2004 ; Dibaba et al. 2015]**. Il a notamment été démontré que l'incidence de l'ACP augmente pour les patients ayant un apport magnésique insuffisant. **[Dibaba et al. 2015]**.

Bien qu'il existe de nombreux transporteurs magnésiques dans la cellule et ses organites, le canal TRPM7, dont l'expression est ubiquitaire dans l'organisme, est présenté comme le principal élément régulateur de l'homéostasie magnésique intracellulaire. [Penner *et al.* 2007 ; Zou *et al.* 2019 ; De Baaij *et al.* 2015] Par conséquent, ce canal cationique non sélectif est un acteur majeur de la prolifération cellulaire dans de très nombreuses lignées appartenant au domaine physiologique [Runnels *et al.* 2001 ; Schmitz *et al.* 2003 ; Baldoli *et al.* 2012 ; Zierler *et al.* 2011 ; Sahni *et al.* 2008] comme pathologique. [Thèse M. Perrière, 2017 ; Fang *et al.* 2013 ; Davis *et al.* 2014 ; Luo *et al.* 2016].

Il a notamment été démontré que le canal TRPM7 est indispensable au maintien de l'homéostasie magnésique et au développement embryonnaire du pancréas [Yee *et al.* 2011]. De plus, il est un acteur majeur de la progression cancéreuse et de la dissémination métastatique dans l'ACP. [Rybarczyk *et al.* 2017 ; Rybarczyk *et al.* 2012] Son expression varie dans de nombreux types de cancer et est doublée dans les tissus d'ACP [Yee *et al.* 2011 ; Rybarczyk *et al.* 2012 ; Yee *et al.* 2016]. De fait, le canal TRPM7 constitue un biomarqueur pronostique particulièrement relevant concernant ce type histologique de cancer.

Néanmoins, il est à noter que l'extrême variabilité génotypique et par conséquent phénotypique existant entre les clones tumoraux rend difficile l'établissement de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques stables dans l'ACP [Hanahan *et al.* 2011]. De plus, le MET, véritable bouclier de la tumeur, exerce une forte protection contre les thérapies, et réduit considérablement les chances d'atteindre une éventuelle cible thérapeutique sur les cellules cancéreuses [Farran *et al.* 2019 ; Allam *et al.* 2017].

C'est pourquoi, de nombreuses études se basent désormais sur la compréhension et la recherche de biomarqueurs et cibles thérapeutiques dans le MET. Bien qu'il existe une certaine hétérogénéité au sein des populations de CSP, celles-ci sont actuellement bien caractérisées. De plus, leur positionnement périphérique à la tumeur, les place en première ligne et les rend particulièrement sensibles aux thérapies anticancéreuses. [Farran *et al.* 2019 ; Allam *et al.* 2017]

Dans ce contexte, la découverte de biomarqueurs et cibles thérapeutiques éventuelles sur le modèle des CSP semble primordial afin de cibler et d'affaiblir le stroma tumoral. Les canaux ioniques et le rôle du magnésium dans le

fonctionnement des CSP activées restent très peu étudiés, et il n'existe aucune étude concernant le rôle du canal TRPM7 dans les CSP activées.

De par son rôle de premier plan dans la prolifération cellulaire et son impact sur le développement de l'ACP, le canal TRPM7 paraît être un candidat sérieux. La compréhension de ses mécanismes d'action au sein des CSP constituerait une avance certaine dans la recherche de biomarqueurs du MET. De fait, l'établissement de son rôle dans la prolifération des CSP permettrait, en le ciblant, d'endiguer la croissance aberrante du stroma tumorale dans l'ACP.

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre le rôle du canal TRPM7 dans l'activation et le développement des capacités prolifératives des CSP.

1) L'objectif principal de ce travail a été de mettre en évidence le lien existant entre le canal TRPM7 et la prolifération cellulaire des CSP activées, et d'identifier les voies de signalisations sous-jacentes ainsi que les acteurs moléculaires associés au processus prolifératif.

2) Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre le rôle du magnésium dans le phénomène de prolifération cellulaire dépendante de TRPM7 sur les CSP activées.

3) L'impact du canal TRPM7 sur l'activation des CSP et notamment sur l'expression du principal marqueur d'activation : α -SMA, ainsi que son rôle sur l'activité proliférative, a également constitué une part importante de ce travail de thèse.

4) Enfin, une étude du niveau d'expression du canal TRPM7 en fonction du degré d'activation des CSP a été réalisée afin d'attester la présence d'un lien entre le canal TRPM7 et l'activation / la quiescence des CSP.

MATERIELS ET METHODES

I) Méthodes de culture cellulaire :

1) Lignées cellulaires:

A) Lignée PS-1 :

Les expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail de thèse sont effectuées sur une lignée de CSP humaine, la lignée PS-1, prélevée et immortalisée depuis un pancréas sain provenant d'un donneur anonyme [Fieke *et al.* 2009]. La lignée PS-1 a été isolée et immortalisée par l'équipe du Professeur Kocher de la Queen Mary University of London, et généreusement offerte au laboratoire. Bien que le pancréas d'origine des PS-1 soit qualifié de sain, ces cellules sont considérées comme étant activées *in vitro*. Néanmoins, n'ayant jamais été en contact avec des cellules cancéreuses ou soumises à des épisodes inflammatoires chroniques, les cellules PS-1 sont théoriquement dans un état d'activation précoce et peu agressives [Fieke *et al.* 2009].

B) Lignée RLT-PSC :

Des expérimentations complémentaires ont également été réalisées sur une deuxième lignée cellulaire de CSP humaine, la lignée RLT-PSC, issue d'une biopsie humaine de pancréatite chronique [Jesnowski *et al.* 2005]. La lignée RLT-PSC est la première lignée de CSP à avoir été immortalisée chez l'humain [Jesnowski *et al.* 2005]. Les cellules ont été généreusement offertes au laboratoire par le Professeur Prevarskaya de l'Université Lille 1. Les RLT-PSC sont des CSP activées par des épisodes inflammatoires chroniques *in vivo* et sont donc considérées comme agressives.

C) Lignée MIA PaCa-2 :

Les expériences de milieux conditionnés ont été réalisées avec la lignée cellulaire d'ACP humaine MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420™). Cette lignée d'ACP a été isolée à partir d'un patient caucasien de 65 ans présentant un cancer de la tête et de la queue du pancréas avec invasion de l'espace périaortique [Wu *et al.* 1977]. La lignée MIA PaCa-2 correspond à un cancer de grade 3, faiblement différencié et aux capacités migratrices et invasives importantes.

2) Conditions de culture :

Les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont cultivées en conditions normoxiques et sans antibiotiques, sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Les 2 lignées de CSP sont cultivées sur flasque de culture T75 dans un milieu DMEM / F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12 ; GIBCO®) contenant de la L-Glutamine, supplémenté avec 10% de SVF Gold (PAA Gold). L'intégralité des expérimentations ont été réalisées entre les passages 40 et 50 concernant la lignée PS-1, et entre les passages 15 et 30 pour la lignée RLT-PSC.

Les cellules MIA PaCa-2 sont cultivées sur flasque de culture T25, dans un milieu DMEM (GIBCO®) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Foetal (SVF ; BioWhittaker®, Lonza) et 1% de L-Glutamine (Glutamax 100X ; GIBCO®). L'ensemble des tests effectués sur cette lignée ont été réalisés entre les passages 17 et 35 après décongélation de l'ampoule initiale.

L'ensemble des expérimentations de culture cellulaire es réalisé dans une pièce dédiée, en condition stérile, sous un poste de sécurité microbiologique de type II.

Les cellules sont séparées de leur support et réensemencées une fois par semaine, lorsqu'elles arrivent à confluence, par action de la trypsine-EDTA (GIBCO®, Life Technologie). Afin de mettre les cellules en suspension, le milieu de culture est enlevé et la flasque rincée avec 5 mL de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline). 1 mL de solution de trypsine-EDTA est ajouté par flasque T25, ou 1,5 mL pour un flasque T75. Les cellules sont incubées pendant 5 minutes à 37°C afin de permettre

la réaction enzymatique. Lorsque les cellules n'adhèrent plus au support et qu'elles sont convenablement individualisées, la réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 5 mL de milieu de culture 10% SVF (riche en inhibiteur de la trypsine). Le décompte de la population cellulaire est réalisé sur lame de Malassez et les cellules ensemencées dans les divers supports expérimentaux. Les lignées sont entretenues par réensemencement des cellules dans les flasques de culture jusqu'à ce qu'elles atteignent un passage critique.

Concernant la lignée PS-1, 8.10^5 cellules sont ensemencées dans un flasque T75, 2.10^5 cellules pour les RLT-PSC présentant une prolifération plus rapide, et 4.10^4 cellules MIA PaCa-2 dans un flasque T25. Ces valeurs ont été mises au point de façon à ce que les populations cellulaires recouvrent 80% de la surface du flasque de culture au bout de 7 jours.

3) Conservation des lignées cellulaires :

Les lignées cellulaires sont conservées par congélation dans un milieu composé de SVF supplémenté de 5% DMSO (DiMéthylSulfOxyde), 4.10^6 cellules sont mises en suspension dans 2mL de SVF 5% DMSO puis placées dans une ampoule de congélation (cryotube) et conservées à -80°C . Lorsque la population cellulaire précédente atteint un nombre de passage critique, une ampoule contenant des cellules de passage inférieur est décongelée et son contenu est dilué dans 25 mL de milieu DMEM/F12 dans un tube de 50 mL (Falcon) pour les cellules PS-1 et RLT. Le tube est centrifugé (1000 rcf pendant 7 minutes), le surnageant contenant le DMSO est enlevé et le culot cellulaire suspendu dans 30 mL de DMEM/F12 10% SVF Gold (PAA Gold). Le volume de milieu est divisé par 3 et 10 mL sont ensemencés dans chaque flasque T75.

Concernant les cellules d'ACP MIA PaCa-2 la décongélation est réalisée dans des flasques T25 avec un milieu DMEM, le protocole, quant à lui, est identique.

Les cellules fraîchement décongelées ne subissent aucune expérimentation pendant deux semaines hormis un décollage hebdomadaire avec la trypsine.

4) Obtention de milieux conditionnés :

La culture cellulaire en milieu conditionné (MC) permet d'étudier les processus de communication, médiés par les facteurs solubles, entre deux types cellulaires.

L'utilisation de MC correspond à la mise en culture d'une population cellulaire dans un milieu contenant les facteurs sécrétés par une autre population de cellules [Storck *et al.* 2017 et Wehr *et al.* 2011].

L'effet des facteurs sécrétés par les MIA PaCa-2 sur la prolifération et l'activation des cellules PS-1 a été étudié au cours de ce travail.

Afin d'obtenir du milieu conditionné de MIA Paca-2 (MCM), 1.10^6 cellules sont ensemencées sur flasque de culture dans un milieu DMEM 10% SVF (supplémenté en L-Glutamine) pendant 24h. Le milieu de culture est remplacé par un milieu de sevrage DMEM/F12 ne contenant aucun SVF pendant 24h. Le milieu contenant les facteurs solubles sécrétés est ensuite récolté, filtré et conservé à -80°C avant utilisation (Figure 31).

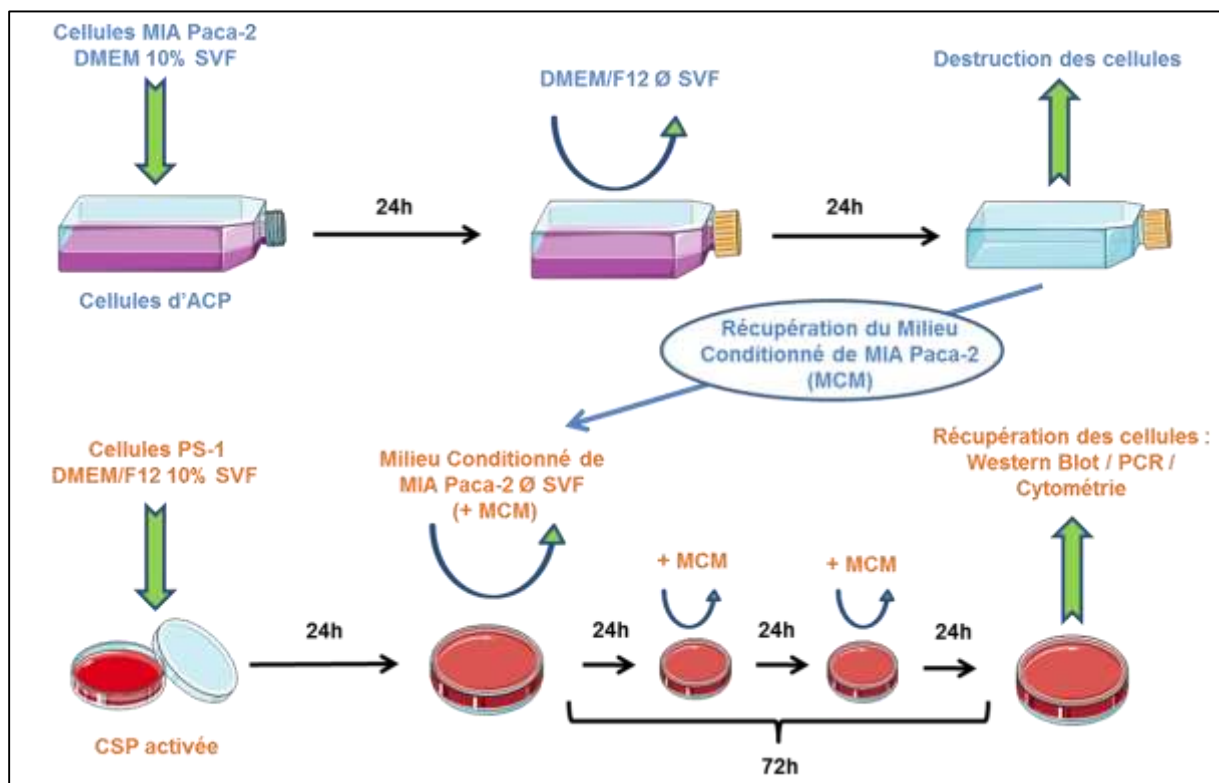


Figure 31) Protocole de culture cellulaire en milieu conditionné :

Le Schéma représente le protocole permettant l'obtention du milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 ainsi que le traitement des cellules PS-1 avec le MCM. Les cellules PS-1 contrôles sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 sans SVF.

Le schéma a été réalisé avec Servier Medical Art.

Les PS-1 sont cultivées dans le MCM pendant 72h, et le milieu est changé toutes les 24h avec apport de MCM « frais » pour un effet prolifératif optimal. Il est à noter que le MCM n'est pas supplémenté avec du SVF. Les cellules contrôles sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 0% SVF pendant 72h avec changement de milieu quotidien, de la même façon que pour les cellules traitées au MCM (Figure 31).

Un protocole similaire a été utilisé afin d'étudier l'impact des facteurs sécrétés par les PS-1 sur la prolifération des cellules MIA PaCa-2.

Les PS-1 sontensemencées à hauteur de 8.10^5 cellules sur boîte 100mm dans du DMEM/F12 10% SVF pendant 24h. De même que pour les cellules d'ACP, le milieu de culture est remplacé par un milieu de sevrage DMEM/F12 ne contenant aucun SVF pendant 48h. Le milieu est ensuite récolté, filtré et conservé à -80°C avant utilisation. Les cellules MIA PaCa-2 sont cultivées dans le milieu conditionné de PS-1 (MCP) dilué au demi dans du DMEM 0% SVF, afin de favoriser la survie cellulaire des MIA PaCa-2. Le milieu MCP/DMEM (50 : 50) est changé quotidiennement au cours de l'évaluation de la cinétique de croissance cellulaire des MIA PaCa-2 et les cellules contrôle sont cultivées dans un milieu DMEM 0% SVF changé toutes les 24h.

5) Conditions de traitements des cellules :

L'ensemble des traitements appliqués aux cellules aux cours des diverses expérimentations sont présentés dans le tableau ci-contre (Tableau 4). Les cellules sont systématiquementensemencées pendant 24h dans les conditions de culture classique de chaque lignée (cf conditions de culture) avant application d'un traitement. A l'issu des 24h post-ensemencement, le milieu de culture est changé et le traitement ajouté à la concentration indiquée, et au temps indiqué, avec un changement de milieu toutes les 24h. Les traitements sont réalisés dans le milieu de culture classique des PS-1, DMEM/F12 10% SVF, à l'exception du TGF- β 1 qui est dilué dans un milieu DMEM/F12 1% SVF. Il est à noter que les effets de l'ATRA sur

les PS-1 n'apparaissent que suite à 1 semaine de traitement, et que le traitement quotidien est maintenu pendant l'évaluation de l'effet de l'ATRA par diverses méthodes expérimentales, les cellules sont donc traitées pendant 2 semaines au total (Tableau 4).

Tableau 4) Traitements appliqués aux cellules

Produit	Fournisseur	Référence	Cible	Concentration / Solvant	Durée du Traitement
Inhibiteurs pharmacologiques					
NS8593	Sigma	N2538	TRPM7 (+SK)	25 µM (DMSO)	48h
Wortmannine	Sigma	W3144	Voie PI3K	1 µM (DMSO)	24h
Nutlin3a	Sigma	N6287	Interaction P53 / MDM-2	20 µM (DMSO)	24h
Agents chimiques divers					
ATRA	Sigma	R2625	Vésicules Lipidiques	1 µM (EtOH 100%)	168h minimum
TGF-β1	Sigma	SRP0300	α-SMA	2 ng / mL (Hcl 1% BSA)	72h

II) Techniques de Biologie Cellulaire :

1) Evaluation de la viabilité cellulaire par métabolisation du MTT :

Le test au MTT est un test colorimétrique permettant de révéler la proportion de cellules métaboliquement actives, donc vivantes, sur une population cellulaire donnée. Le MTT est métabolisé en formazan par la réductase mitochondriale des cellules métaboliquement viables, ce qui forme des cristaux de couleurs mauve. Le MTT est une molécule photosensible et commercialisée sous forme de poudre (Sigma-Aldrich). Il doit être solubilisé dans le milieu de culture (DMEM sans SVF) à la concentration de 0.5 mg/mL.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (NUNCLON™ Delta surface) à la concentration de $6 \cdot 10^4$ cellules dans 1 mL de milieu par puits. La durée du test ainsi que les traitements appliqués aux cellules sont variables. Une mesure de viabilité est réalisée toute les 24h afin d'établir une cinétique de croissance cellulaire. Pour quantifier la viabilité cellulaire, le milieu de culture des puits à tester est remplacé par une solution de MTT (1 mL à 0,5 mg/mL) et les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 37°C. Après incorporation du MTT, les cellules sont dissoutes dans 800µl de DMSO (100%). La dissolution des cellules et des cristaux de formazan qu'elles contiennent forme une solution plus ou moins colorée. Le volume de DMSO est divisé en 4 et placé dans les puits d'une plaque 96 puits.

Les plaques sont lues à l'aide d'un imageur (Infinite F200 PRO, TECAN) à la longueur d'onde de 550 nm, la lecture est assistée par ordinateur grâce au logiciel Tecan-i-control. Le logiciel fournit les valeurs d'absorbance de chaque puits.

2) Evaluation de la viabilité/mortalité cellulaire par traitement au BT :

Le Bleu Trypan (BT) est un colorant azoïque connu pour induire la mortalité des trypanosomes, parasites responsables de la maladie du sommeil.

Le test de décompte des cellules viables par inclusion/ exclusion du BT s'effectue en parallèles de tests de viabilité au MTT et de mortalité cellulaire en cytométrie de flux.

Le BT étant perméant à la membrane plasmique, il pénètre dans les cellules et colore le cytoplasme en bleu. Les cellules viables sont en mesure d'exclure activement le colorant et n'arborent aucune coloration, alors que les cellules mortes apparaîtront colorées. Les cellules viables et mortes sont ensuite comptées sur cellules de Malassez. Cette méthode permet alors de déterminer à la fois le nombre de cellules viables (valeur exprimée en nombre de cellules totales) ainsi que le pourcentage de mortalité (nombre de cellules viables/nombre de cellules mortes).

Les cellules ($8 \cdot 10^4$) sont ensemencées sur boîtes 35mm pendant 72h, rincées au PBS puis décollées par action de la trypsine (350 μ l, 5 min). Parallèlement, leur milieu de culture est récupéré et son volume finement estimé. La suspension cellulaire diluée dans la trypsine est ajoutée au volume de milieu et homogénéisée. Puis, 200 μ l de suspension cellulaire est prélevé auquel sont ajoutés 50 μ l de BT, la solution est homogénéisée puis 10 μ l sont prélevés et placés sur une lame de Malassez. Les cellules sont ensuite comptées et les paramètres suivants sont estimés :

- Nombre de cellules totales = (Nombre de cellules x4) x (volume estimé + 350 μ l)
- Pourcentage de cellules mortes = (Nombre de cellules colorées / nombre de cellules totales) x 100

3) Analyse cellulaire par cytométrie de flux :

La cytométrie de flux repose sur la détection optique de divers paramètres tels que la granulosité, la taille mais également la fluorescence d'une particule en suspension. Le cytomètre en flux, comporte un système de détection optique associé à divers lasers d'émission permettant d'exciter un large spectre de fluorochromes. Les échantillons sont collectés par l'appareil et passent simultanément devant le système de détection optique et d'excitation laser, les valeurs correspondant aux divers paramètres sont enregistrées.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire :

La prolifération cellulaire est évaluée en utilisant la technique de cytométrie de flux. Cette technique repose sur l'utilisation de laser capable d'exciter un intercalant de l'ADN : l'Iodure de Propidium (IP) et d'enregistrer sa longueur d'onde d'émission. L'iodure de propidium émet à 631 nm suite à sa stimulation par une longueur d'onde de 488 nm. L'IP n'émet à cette longueur d'onde que s'il est lié à l'ADN et non sous forme libre.

Le cytomètre permet de représenter les résultats sous forme de graphique de l'intensité de fluorescence de l'IP (FL2) en fonction du nombre de cellules passées devant le détecteur optique (Count). L'intensité de fluorescence enregistrée à 631 nm dépend donc de la quantité d'ADN présent dans la cellule. Cette quantité étant variable d'une phase du cycle à l'autre (les phases G2/M comportent 2 fois plus d'ADN que les phases G0/G1) cela permet de quantifier le pourcentage de cellules présentes dans chacune des phases du cycle (Figure 32).

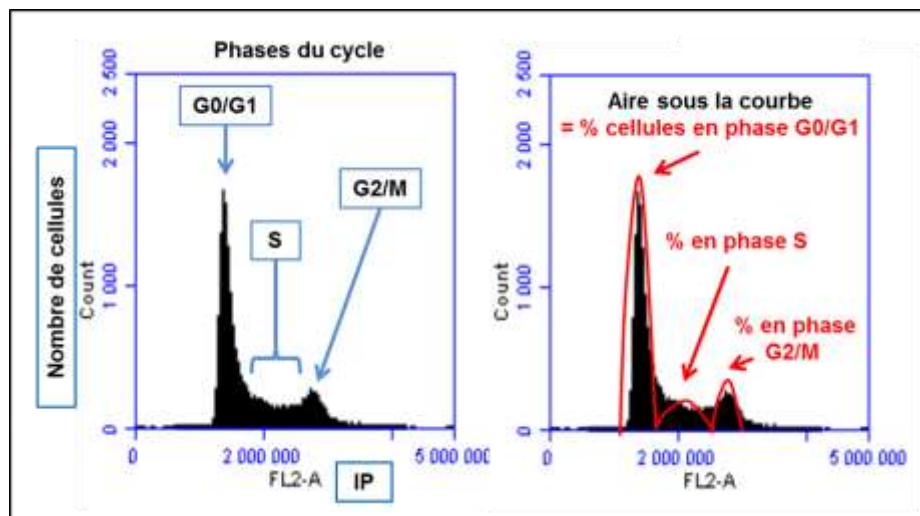


Figure 32) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux :

Le schéma représente le profil de répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire ainsi que la méthode de calcul du pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle.

Pour cela $1 \cdot 10^6$ cellules PS-1 ou $0,5 \cdot 10^6$ cellules RLT-PSC sont cultivées sur boîtes 100mm (le niveau d'ensemencement ainsi que le temps d'incubation dépendent du

type d'expérimentation, à savoir, présence ou non de SVF, transfection, molécule testée). Après un temps d'incubation variable, les cellules sont rincées au PBS et décollées à la trypsine pendant 5 minutes. Les cellules sont remises en suspension dans des tubes contenant 3 mL de milieu DMEM/F12 10% SVF puis centrifugées 7 minutes à 1000 rcf. Le surnageant est enlevé et les cellules remises en suspension dans le PBS pour être centrifugées de nouveau (7 min ,1000 rcf). L'opération est répétée 2 fois avant que le surnageant ne soit enlevé définitivement. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 150µl de PBS-EDTA (5mM) auquel sont ajouté 350µl d'éthanol absolue, la suspension est vortexée puis conservée à 4°C pour un minimum de 6h.

Cette étape de fixation dans l'éthanol 70% rend la membrane cellulaire perméable et permet l'entrée de l'IP.

Après fixation, les cellules sont incubées dans 100µl de PBS-EDTA auquel est ajouté 2µl de RNase A (20mg/mL) pendant 30 minutes à température ambiante (RTC). Cette étape est indispensable afin d'éviter que l'IP ne forme des complexes avec les ARN présents dans le cytosole et ne biaisent les résultats.

Les échantillons sont ensuite placés à 4°C (sur glace) afin de limiter l'activité RNAase, et d'éviter une éventuelle dégradation de l'ADN.

Avant collecte des échantillons par l'appareil, 100µl de solution de PBS-EDTA contenant 1/10^{ème} IP (Sigma) sont ajoutés aux échantillons puis placés dans le cytomètre. Le cytomètre (Accuri C6, BD Bioscience) rend possible la mesure de la fluorescence de l'IP grâce au laser FL-2 capable d'exciter la molécule à 488nm.

Les profils de cycles cellulaires enregistrés sont ensuite analysés grâce au logiciel Cyflogic v1.2v1, permettant de quantifier le pourcentage de cellule dans chaque phase du cycle (Figure 32).

B) Evaluation de l'apoptose cellulaire :

L'évaluation de l'apoptose cellulaire en cytométrie de flux implique l'utilisation de deux fluorochromes en co-marquage, l'IP et l'annexin-V-FITC. L'IP est un intercalant de l'ADN et l'annexine-V est une protéine ayant une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS) membranaire. Lors de la phase précoce d'apoptose, un phénomène dit d'inversion membranaire est observé, il correspond à l'échange de la

localisation des deux feuillet phospholipidiques. Ainsi, le feuillet physiologiquement endosomal se retrouve en contact avec le milieu extracellulaire dans un contexte apoptotique. La composition de la membrane plasmique est asymétrique et les phospholipides et protéines présents varient d'un feuillet à l'autre. Ainsi la PS est exprimé uniquement dans le feuillet membranaire interne et d'autres espèces comme la sphingomyeline est, à l'inverse, uniquement présentes dans le feuillet externe. Dans le cas d'une apoptose cellulaire précoce l'inversion membranaire rend accessible la PS à l'annexine-V couplé au fluorochrome FITC, permettant l'émission de celui-ci. L'utilisation de l'annexine-V-FITC nous permet donc de marquer et de dénombrer les cellules en apoptose précoce.

L'IP, n'étant pas perméant à la membrane plasmique, celui-ci ne peut marquer les cellules qu'en cas de rupture de l'intégrité membranaire. En effet, contrairement au protocole d'analyse du cycle cellulaire, les cellules ne sont pas fixées ni perméabilisées. La fluorescence de l'IP n'est donc visible qu'en présence d'une perméabilisation membranaire atypique, comme c'est le cas durant la nécrose ou dans les phases tardives de l'apoptose.

Chaque cellule détectée par le cytomètre est classée en fonction de son intensité de fluorescence pour l'Annexin-V-FITC (AV) (stimulée par le laser FL1) et pour l'IP (stimulé par FL2). Le graphique correspondant présente ainsi des populations cellulaires différentes réparties sur un quadrant.

Ainsi : la population IP-/AV- (marquage très faible voire nulle pour les deux fluorochromes) correspond aux cellules vivantes.

La population IP-/AV+ correspond aux cellules en apoptose précoce.

Les cellules IP+/AV- sont en situation de nécrose. Et la population fortement fluorescente pour les deux marqueurs (IP+/AV+) correspond aux cellules en situation d'apoptose tardive et/ou de nécroptose (Figure 33).

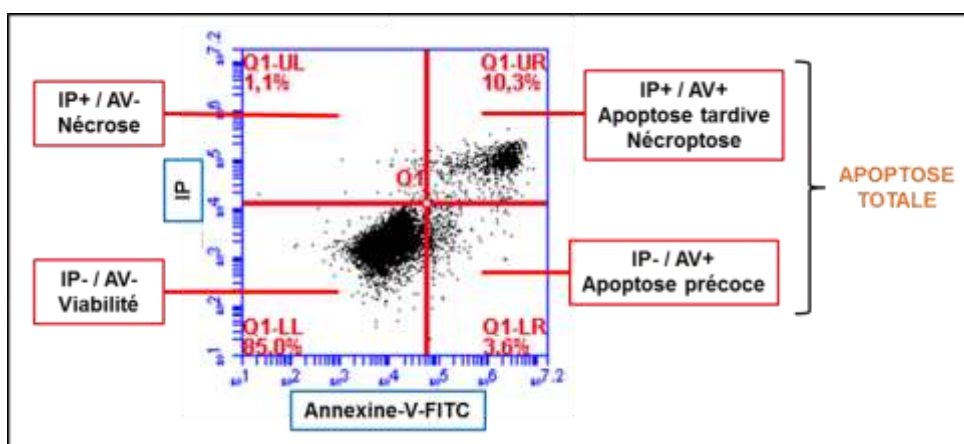


Figure 33) Evaluation de la mortalité cellulaire par cytométrie de flux :

Représentation d'une population cellulaire répartie en fonction du marquage pour l'IP et l'Annexine-V. La population cellulaire apoptotique totale correspond à la somme des populations cellulaires dans les quadrants de droite.

Afin de déterminer les 4 zones du quadrant une mise au point est réalisée avec des marquages uniques. La mortalité cellulaire est induite en chauffant les tubes contenant la suspension cellulaire à 80°C pendant 10 minutes et un marquage simple est réalisé. Dans un échantillon cellulaire pour lequel la mortalité a été induite, les cellules sont marquées à l'IP ce qui permet de déterminer la zone correspondant uniquement à la nécrose et nécroptose. L'autre échantillon est monomarké pour l'AV seule, ce qui permet de révéler la zone correspondant uniquement à l'apoptose précoce. Les cellules viables apparaissent dans la zone de faible intensité de fluorescence pour les deux marqueurs indépendamment du marquage réalisé.

La mise au point permettant de placer correctement les cadrant d'analyse est faite avant chaque expérimentation, l'apoptose est déterminé par addition des zones à fort marquage pour l'AV (Figure 33).

1.10⁶ cellules PS-1 sontensemencées dans des boites 100 mm et cultivées pendant une durée variable en fonction du traitement appliqué. A l'issu du traitement, le milieu contenant les cellules flottantes mortes est récupéré dans un tube (Falcon) et les boites sont rincées avec 1 mL de PBS qui est également récupéré. Les cellules adhérentes sont incubées 5 minutes à 37°C dans 1 mL de trypsine-EDTA puis le volume de suspension cellulaire est ajouté au milieu préalablement récupéré. Les

tubes sont centrifugés 7 minutes à 1000 rcf, le surnageant est enlevé et le culot cellulaire remis en suspension dans 2 mL de PBS. Les cellules sont de nouveau centrifugées et le culot cellulaire est suspendu dans 100 µl de tampon ABP (Apoptosis Binding Buffer : 0,1M HEPES pH 7,4 ; 25 mM CaCl₂ ; 1,4M NaCl) dilué au 1/10^{ème} dans le PBS. Puis, 5 µl d'AV et 5µl d'IP (50 µg/mL) sont ajoutés à la solution, l'IP et l'AV sont laissés en contact avec les cellules pendant 15 minutes à température ambiante, puis 400 µl de tampon ABP dilué au 1/10^{ème} sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite passés au cytomètre en flux.

4) Evaluation de la migration cellulaire par insert de Boyden :

Le test de migration utilise un système de chambre de Boyden qui permet de mettre en évidence la mobilité des cellules en culture. Il s'agit d'un système d'insert de polyéthylène téréphtalate (PET ; Falcon) dont le fond est percé de pores de 8 µm de diamètre. Le diamètre des pores ne permet pas aux cellules non-migrantes de traverser l'insert car la cellule doit se déformer pour traverser le pore. Les inserts contenant chacun 5.10⁴ cellules MIA Paca-2 ainsi que 200µl de milieu, sont placés dans les puits d'une plaque 24 puits (Falcon). Chaque puits contient 800µl de milieu de même composition que celui des inserts (Figure 34).

Après un temps d'incubation de 2h dans du milieu DMEM 10% afin de permettre l'adhérence cellulaire, le milieu contenant les oligopeptides (AG-9 ou VG-6) est ajouté. Après 24h d'incubation les inserts sont rincés au PBS (10 mM, pH 7.4 ; Sigma-Aldrich) pendant 2 minutes. Les cellules sont ensuite fixées au méthanol 100% (Sigma) pendant 10 minutes et rincées de nouveau au PBS. Les inserts sont colorés à l'hématoxyline (HSM, Accustain, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes, puis, 3 lavages successifs à l'eau (non-filtrée, non-stérile), de 2 minutes chacun sont effectués. Les cellules n'ayant pas migrées sont éliminées de la face interne à l'aide d'un coton-tige. Les inserts sont hydratés par ajout de 200µL de PBS. Ils sont ensuite observés au microscope inversé (Nikon Eclipse TS100), les cellules ayant traversé la membrane sont comptées à l'objectif x40 sur l'ensemble de l'insert (~ 20 champs).

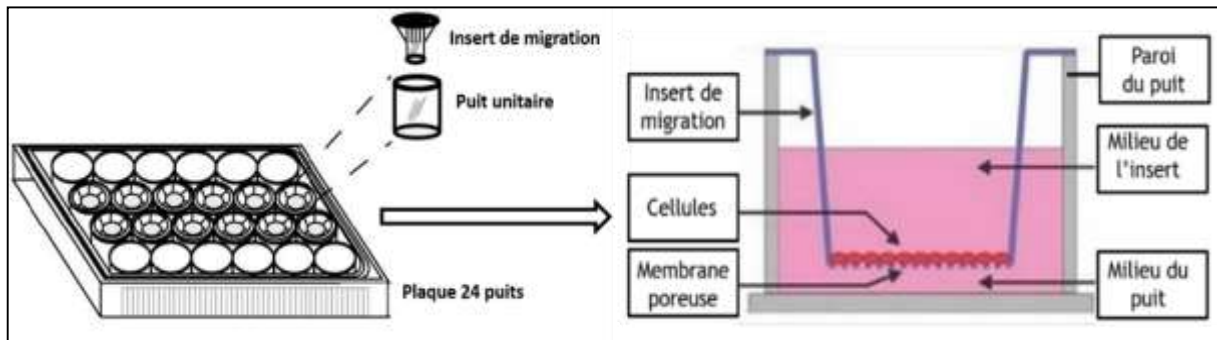


Figure 34) Dispositif expérimental de migration cellulaire en insert de Boyden :

Représentation du dispositif de chambre de Boyden permettant d'évaluer la migration cellulaire. Les milieux de cultures dans le puit et l'insert sont identiques car la migration cellulaire n'est pas induite par chimiotactisme.

III) Méthodes de biologie moléculaire :

1) Transfections et ARN interférents :

La transfection cellulaire est une technique permettant de faire pénétrer du matériel génétique exogène dans une cellule sans utiliser de vecteurs viraux. Afin de rendre la cellule perméable à des oligonucléotides d'origine extérieure, il est possible de modifier de façon transitoire la perméabilité membranaire. Dans le but de réaliser une inhibition de l'expression du canal TRPM7 par des ARN interférents (siRNA) dans les cellules MIA Paca-2, la méthode d'électroporation par l'appareil AMAXA a été utilisée. Les ARN interférents ou siRNA sont de petits ARN de synthèse dont le mode d'action est basé sur le fonctionnement des micros ARN naturellement présents dans la cellule. Cet outil de biologie moléculaire permet d'éteindre la traduction d'un ARNm en protéine (Tableau 5).

Tableau 5) Séquences des siRNA utilisés :

siRNA	ARN cible	Séquence
siContrôle (siCTRL)	Aucun	5'-CUGGACAUGGACCAAGUGGACUU-3'
siTRPM7	TRPM7	5'-GUCUUGCCAUGAAAUACUCUU-3'

La méthode de transfection par électroporation a été réalisée selon le protocole suivant : Dans un premier temps, le volume de milieu contenant 10^6 cellules est centrifugé pendant 7 minutes à 1500 rcf dans un microtube de 2 mL (Eppendorf). Le surnageant est enlevé et le culot cellulaire resuspendu dans 100 μ l de tampon d'électroporation (Amaxa kit L, Lonza) auquel on ajoute 2 μ g de siRNA (Dharmacon Research, USA) soit 3,75 μ l de solution de siRNA à 1,87 μ g/ μ l. Le « mix » de transfection est transféré dans une cuve à électroporation (Amaxa kit L, Lonza), la cuve est ensuite placée dans un nucleofecteur (Nucleofector™ II, Amaxa). Le programme de transfection utilisé dépend de la ligné transfectée, les cellules PS-1 et RLT-PSC sont transfectées avec le programme BHK-21 (X-031), les MIA PaCa-2 avec le programme Panc-1 (X-005).

Les cellules sont soumises à un bref courant électrique de faible intensité permettant de perméabiliser de façon transitoire la membrane plasmique et de faire rentrer les siRNA. Les cellules transfectées sont ensuite transférées dans les supports de culture destinés à la réalisation des protocoles expérimentaux.

2) Extraction des acides nucléiques :

Les extractions d'ARN sont effectuées sur les cellules cultivées dans des boites de 60 mm de diamètre (nuncleon® delta surface, Thermofisher Scientific) afin d'extraire une quantité de matériel génétique suffisante. Lorsque les cellules recouvrent 80% de la surface de la boite ($\sim 5 \cdot 10^5$ cellules), le milieu de culture est enlevé et la boite est lavée au PBS stérile (Sigma-Aldrich). 500 μ l de Trizol (Tri Reagent^R, Sigma) sont ensuite versés sur la surface de la boite. Après homogénéisation, le Trizol contenant les cellules lysées est mis dans un microtube de 1,5 mL (Eppendorf). Les échantillons sont ensuite repris sur glace et extraits grâce au protocole d'extraction au 4-bromo-3-chloropropane et isopropanol suivit d'un rinçage à l'éthanol 70%.

L'extrait résultant est repris dans 22 μ L d'eau stérile et dosé au Nanodrop, afin de déterminer la concentration en ARN de l'échantillon et d'en estimer la pureté. La concentration de l'échantillon est ramenée à 2 μ g d'ARN pour 10 μ L d'eau stérile, le tout est incorporé au mélange de Retro Transcription (RT ; Multiscribe™, Applied Biosystems™). Le mélange total de RT (10 μ L d'échantillon dilués dans l'eau + 10 μ L de tampon de RT) est placé au thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf). Le

programme de RT comprend : une phase d'hybridation des amorces sur l'ARN (10 minutes, 25°C), une phase de synthèse d'ADNc (2h, 37°C), ainsi qu'une phase de séparation des amorces, des ARN et des ADNc néosynthétisés (5 minutes, 85°C). Cette étape permet, par l'action enzymatique de la transcriptase inverse, de retro-transcrire les ARN extraits en ADN complémentaires (ADNc).

3) Technique de PCR:

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) permet de réaliser plusieurs centaines de copies du gène d'intérêt par réactions de polymérisation en chaîne. La PCR permet donc de visualiser le niveau relatif d'expression du gène d'intérêt, ou, plus simplement, son état d'expression dans la cellule (exprimé ou non). Suite à l'étape de Retro Transcription, 1 µL d'échantillon est prélevé et ajouté au mélange de PCR Invitrogen™ pour un volume final de 50µl. Le mix de PCR est composé de : 36,2 µl d'eau ; 5 µl de Tampon de réaction 10X ; 1,5 µl de MgCl₂ à 50 mM ; 1µl de 10 mM dNTPs mix ; 2,5µl de chaque primers (R et F ; tableau 6) à 5µM et 0,3µl de Taq Polymérase.

Le tube est placé dans le Thermocycleur et le programme de PCR en 40 cycles est lancé. Le programme débute par une phase de dénaturation visant à séparer les doubles brins d'ADN (94°C, 4 minutes), suivie d'une phase d'hybridation permettant l'appariement des amorces (58°C, 30 secondes). Ensuite, il y a une phase d'élongation correspondant à la synthèse du brin d'ADNc (faite à la température optimale d'activité de la Taq Polymérase, 72°C, 45 secondes). Ces 3 phases forment un cycle de PCR et sont répétées 40 fois.

Tableau 6) Primers utilisés en PCR :

Cible	Amorces	Amplicons
β-Actine	Sens : 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' Antisens : 5'ACGTACATGGCTGGGGTG-3'	210 bp
TRPM7	Sens 5'-GTCACCTGGAAACTGGAACC-3'	273 bp

	Antisens 5'-CGGTAGATGGCCTTCTACTG-3'	
TRPM6	Sens : 5'GAGGAGATGGATGGGGGC-3' Antisens : 5'-GG TCCAGTGAGAGAAAGCCAA-3'	413 bp
GAPDH	Sens : 5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3' Antisens : 3'- AGAAGGCTGGGGCTCATTG-5'	165 bp

La PCR est suivie par une étape de migration des échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose avec révélation au Bromure d'Ethidium (BET ; 10mg/ml ; Sigma-Aldrich). La migration polarisée des échantillons s'effectue dans un gel de Tris Acetate EDTA 0,5X (TAE ; Sigma-Aldrich) concentré à 1,5% d'agarose. Le gel est plongé dans la cuve d'électrophorèse (Embi Tec, RunOne Electrophoresis Cell) contenant du tampon de migration TAE dilué au 1/2.

Après migration des échantillons, le gel est transféré au révélateur (Imageur Berthold ChemiBis) et les échantillons sont révélés sous UV (grâce au BET), le logiciel Quantity One (Biorad) permet de réaliser des captures d'images pour visualiser les produits de PCR. Le but des manipulations de PCR étant de révéler uniquement la présence des canaux TRPM7 et TRPM6, aucune quantification ne sera réalisée avec le logiciel. Les résultats seront donc présentés sous forme de bandes situées en face de leur poids moléculaire exprimé en paires de bases (pb).

4) Technique de qRT-PCR :

A l'instar de la PCR classique, la qRT-PCR ou RT-PCR quantitative est basée sur l'amplification de gènes. Toutefois, cette technique permet de quantifier de façon plus fiable leurs niveaux d'expression. La quantification est faite en temps réel par mesure de la fluorescence du SYBR Green (SYBR Green I Master, Light Cycler®, Roche). Cette intercalant de l'ADN émet à une longueur d'onde de 520 nm lorsqu'il est fixé à une molécule d'ADN double brin. Ainsi, l'intensité de la fluorescence émise par le fluorophore est fonction de la quantité d'ADNc néosynthétisée, cette quantité étant elle-même dépendante du niveau d'expression du gène.

Le mélange de Q-PCR contient 2 μL d'ADNc dilués au 1/20 (issus du mélange de RT), 0,5 μL de chaque amorces diluées à 10 μM (sens et antisens), 1,6 μL d'eau stérile, ainsi que 4,6 μL de mélange SYBR Green. Au total, 9,2 μL de mélange de qRT-PCR est préparé pour chaque échantillon. Les différents échantillons sont déposés dans une plaque de 384 puits (Light Cycler®, Roche). Une fois les dépôts réalisés, la plaque est placée au Thermocycleur (Light Cycler® 480 II, Roche) et le programme de PCR est lancé. Le programme comporte, une phase de dénaturation (95°C, 5 minutes), ainsi qu'une phase d'amplification durant laquelle la quantification est réalisée (95°C, 10s ; 60°C, 15s ; 72°C, 20s) répétée 45 fois. Après la phase d'amplification, le programme enclenche une phase de fusion (97°C en continu) permettant de renseigner l'efficacité des amorces. De même que pour la RT-PCR, la β -actine est utilisée comme gène de référence en raison de son expression stable dans les CSP. La quantification est réalisée avec le logiciel Microcal Origin 7 (Microcal Software) grâce à la formule de PffafI basée sur l'efficacité des amorces utilisées [PffafI *et al.* 2001].

IV) Technique d'analyse des protéines :

1) Western Blot :

Le Western Blot (WB) est une technique d'immunodétection semi quantitative des protéines permettant principalement de comparer l'expression de protéines d'intérêt entre plusieurs conditions.

A) Extraction des protéines :

Les cellules sont cultivées sur boîte de 100 mm pendant une durée variable en fonction des conditions testées. Les boîtes sont rincées avec 4 mL de tampon PBS puis décollées du support par ajout de 1mL de trypsine EDTA et incubé 5 minutes à 37°C. Les cellules sont récupérées dans le PBS et dénombrés sur lame de Malassez. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 7 minutes à 1500 rcf puis

les protéines sont extraites du culot cellulaire par ajout de 50 µl de tampon Laemmli 1x (dilué au 5^{ème} dans l'eau 18 mΩ) pour chaque 1.10^6 cellules. Le culot cellulaire est mis en suspension dans le tampon puis laissé 30 minutes sur glace à 4°C afin de finaliser l'extraction (Tableau 7).

Les extraits protéiques sont ensuite centrifugés 15 minutes à 1500 rcf et le surnageant contenant les protéines est récupéré, les échantillons sont stockés à -80°C ou immédiatement dénaturés pour analyse.

B) Séparation des protéines :

Les échantillons protéiques en condition dénaturante et réductrice sont ensuite dénaturés pendant 10 minutes à 95°C. 40 µL d'échantillon protéique dénaturé est ensuite placé dans les puits d'un gel de polyacrylamide réalisé en parallèle. Le gel de polyacrylamide permettant la migration des échantillons protéiques comporte deux parties distinctes : un gel de concentration comportant 5% de polyacrylamide dans lequel sont délimités les puits, et un gel de séparation contenant 12% de polyacrylamide. Les deux gels contiennent également du SDS afin de garantir une dénaturation permanente des protéines durant la migration. Après dépôt des échantillons dans les puits, le gel est transféré dans une cuve contenant un tampon de migration (Biorad). La migration des échantillons protéiques se fait en 1h par imposition d'un courant polarisé de 200 mV par un générateur (Biorad). Les protéines, alors chargées négativement par fixation du SDS, migrent en fonction de leur poids moléculaire exprimé en kDa. Lorsque les échantillons sont convenablement séparés le gel est récupéré en vue de transférer les protéines qu'il contient sur une membrane de nitrocellulose permettant de rendre les protéines accessibles aux anticorps. Les protéines sont transférées par la méthode de transfert liquide dans une cuve contenant un tampon de transfert (tableau 7). Le transfert polarisé des protéines vers la membrane de nitrocellulose nécessite l'application d'un courant de 100 mV pendant 1h. Le transfert est réalisé sur glace à 4°C.

Une fois que les protéines sont adsorbées sur la membrane, celle-ci est récupérée et mise en contact avec une solution de TBS-T contenant 3% de BSA (Tris Buffer Saline 0,1% Tween 20, 3% Bovine Serum Albumine) pendant 1h. La BSA permet

de bloquer les sites protéiques de faible affinité sur lesquels les anticorps pourraient se fixer de manière aspécifique.

C) Révélation des protéines :

Après blocage de la membrane, la solution d'anticorps (dilué dans le TBST 3% BSA) est ajouté et la membrane incubée pendant 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C (Tableau 8). A l'issue du marquage avec l'anticorps primaire la membrane est rincée 3 fois avec une solution de TBS-T puis mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (horseradish peroxydase) dilué dans le TBS-T 3% BSA pendant 50 minutes. Les anticorps secondaires sont des anti-IgG de souris (Cell Signaling, 7076S) ou des anti-IgG de lapin (Cell Signaling, 7074S) en fonction de l'espèce de l'anticorps primaire. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois au TBS-T puis 1 fois au TBS 1x afin de diluer le détergeant Tween 20.

Les protéines sont ensuite révélées par ajout du réactif ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Biorad) et la chimioluminescence est visualisé grâce au système MF-ChemiBIS 2.0 (DNR BIO Imaging System). L'expression protéique relative est quantifiée sur les images obtenues grâce au logiciel QuantityOne (Biorad).

Tableau 7) Solutions tampons utilisées en Western Blot :

Tampon	Composition
Extraction (Laemmli 5x)	5 mL Tris/HCl 0,5M pH 6,8 ; 4 g glycérol ; 2 g SDS ; 1,25 mL Bleu de bromophénol 1% ; 5 mL β -mercatoéthanol ; Ajuster à 20 mL avec de l'eau 18 m Ω
Migration	100 mL Tampon tris-glycine 10x ; 10 mL SDS ; 890 mL Eau 18 m Ω
Transfert	100 mL Tampon tris-glycine 10x ; 200 mL Méthanol ; 700 mL Eau 18 m Ω

2) Technique d'Immunofluorescence :

La technique d'immunofluorescence (IF), repose sur l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome. De la même façon qu'en Western Blot, les protéines cibles sont reconnues par des anticorps primaire spécifique qui sont à leur tour reconnu et liés par des anticorps secondaire portant un fluorochrome sur la fraction constante. La protéine d'intérêt, alors porteuse du complexe anticorps primaire / secondaire / fluorochrome est placée sur un dispositif de microscopie, analogue au cytomètre, comportant un capteur optique couplé à des lasers d'émissions.

L'échantillon est stimulé par les lasers permettant l'émission des fluorochrome portés par les protéines d'intérêt, l'enregistrement de la longueur d'onde d'émission est assisté par ordinateur.

30.10^3 cellules PS-1 ou 15.10^3 RLT-PSC sont tout d'abordensemencées sur des lamelles de verre (LabTek) de diamètre 14mm et cultivées sur plaque 24 puits pendant une durée variable en fonction de l'expérimentation. Toute expérimentation impliquant une mesure de fluorescence nécessite l'utilisation du verre, matériau neutre, n'émettant aucune fluorescence parasite en réponse à une quelconque longueur d'onde excitatrice.

Les lames sont rincées au PBS deux fois, puis, les cellules fixées par l'action du PFA 4% (ParaFormaldéhyde) dilué dans le PBS à 37°C pendant 20 minutes. Suite à cela, les lamelles sont rincées 2 fois et les cellules perméabilisées au Triton 0.5%, dilué dans le PBS, pendant 10 minutes. Les sites de fixation aspécifique sont ensuite bloqués par une solution de PBS-0,1% Tween- 5% BSA pendant 30 minutes.

Les cellules sont ensuite incubées dans l'anticorps primaire dilué dans le PBS-0,1% Tween- 5% BSA (Tableau 5 ; voir IF) pendant 2h à température ambiante ou durant la nuit en chambre froide (4°C). Suite à cela, les cellules sont rincées 2 fois au PBS-Tween puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à un groupement fluorescent (dilué dans le PBS-0,1% Tween-5% BSA) pendant 45 minutes à température ambiante. En fonction de l'espèce de provenance de l'anticorps primaire, les anticorps secondaires utilisés sont des anti IgG de lapin émettant dans le rouge (Dye Light 549, ThermoFischer, 84541) ou des anti IgG de souris qui émettent dans le vert (Alexa Fluor 488, ThermoFischer, A32723).

Les lamelles sont ensuite rincées 2 fois au PBS-0,1% Tween puis la chromatine contenue dans le noyau est marquée par ajout d'une solution de DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) pendant 30 secondes. Après un dernier rinçage au PBS, les cellules sont montées sur lame par ajout de 5µL de milieu de montage entre lame et lamelle. Les lames sèchent à température ambiante pendant un minimum de 10h avant d'être lues au microscope à fluorescence.

La lecture des lames est effectuée sur un microscope à épifluorescence (Zeiss ®) avec l'aide du logiciel ZEISS. Les lasers pour l'excitation des fluorochromes sont sélectionnés et la mise au point est faite sur le DAPI colorant le noyau des cellules. La durée de l'excitation du fluorochrome par le laser est mise au point afin d'éviter la saturation de l'image.

Tableau 8) Liste des anticorps primaires utilisés en WB et IF :

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution (I^{aire} ; II^{aire})	Espèce
<i>Canaux ioniques</i>				
Anti-TRPM7	Abcam	ab109438	1/1000 ; 1/3000 IF : 1/250 ; 1/250	Lapin
<i>Protéines du cytosquelette</i>				
Anti-GFAP*	Abcam	ab7260	1/500 ; 1/2000 IF : 1/500 ; 1/500	Lapin
Anti-Desmine	Abcam	ab15200	1/3000 ; 1/4000 IF : 1/500 ; 1/500	Lapin
Anti-Vimentine	ThermoFischer	MA5-16409	1/1000 ; 1/3000 IF : 1/1000 ; 1/1000	Lapin
Anti-α-SMA	Abcam	ab7817	1/1000 ; 1/3000 IF : 1/1000 ; 1/1000	Souris
<i>Protéines de signalisations</i>				
Anti-P-ERK1/2	Cell Signaling	9101S	1/1000 ; 1/3000	Lapin

Anti-ERK1/2	Cell Signaling	9102S	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-P-Akt	Cell Signaling	9271S	1/250 ; 1/1000	Lapin
Anti-Akt	Cell Signaling	9272S	1/500 ; 1/2000	Lapin
Anti-P-Smad2	Abcam	ab53100	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-Smad2	Abcam	ab63576	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-P-GSK3 β	Abcam	ab75814	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-GSK3 β	Abcam	ab32391	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-P-MDM2	Abcam	ab170880	1/1000 ; 1/3000	Lapin
Anti-MDM2	Abcam	ab38618	1/1000 ; 1/3000	Lapin
<i>Protéines du cycle cellulaire</i>				
Anti-PCNA	Abcam	ab29	1/1000 ; 1/3000	Souris
Anti-Cycline E1	Abcam	ab133266	1/500 ; 1/2000	Lapin
Anti-CDK-2	CellSignaling	2546S	1/500 ; 1/2000	Lapin
Anti-P53	SantaCruz	sc126	1/500 ; 1/2000	Souris
<i>Protéines apoptotique</i>				
Anti-Bax	Abcam	ab32503	1/200 ; 1/1000	Lapin
Anti-Bcl-2	Abcam	ab196495	1/200 ; 1/1000	Lapin
Anti-Caspase-3	Abcam	ab32351	1/1000 ; 1/3000	Lapin
<i>Protéine de référence</i>				
Anti-GAPDH	Abcam	ab8245	1/4000 ; 1/4000	Souris
* Les anticorps sont dilués dans le tampon TBS-Tween 3% BSA, sauf l'anti-GFAP qui nécessite l'utilisation d'un tampon TBS-Tween contenant 5% de BSA.				

V) Méthodes d'imagerie cationique :

1) Mesure de l'entrée cationique :

L'imagerie cationique est une technique de physiologie cellulaire permettant de visualiser la fluorescence de sondes spécifiques aux cations. Toute variation de la concentration calcique intracellulaire est visible en temps réel par mesure de la fluorescence. Cette technique fait appel à l'utilisation de sondes calciques dérivées de l'aequorine (*aequoria victoria*), ces sondes sont capables de chélater le calcium avec une affinité moyenne ($K_d = 140 \text{ nM}$). La formation d'un complexe avec le calcium modifie le spectre d'excitation de la sonde (Figure 35). En effet, le Fura-2, qui est la principale sonde calcique utilisée lors des expérimentations d'imagerie calcique, possède des longueurs d'ondes d'excitation différentes en fonction de son état de liaison au calcium. Lorsque le Fura-2 est sous sa forme libre il possède une longueur d'onde d'excitation de 380nm. Une fois liée au calcium, la sonde Fura-2 possède une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et n'émet plus en réponse à une stimulation à 380 nm. Le Fura-2 émet à 510 nm indépendamment de sa liaison au calcium, car seule la longueur d'onde de stimulation varie en fonction de l'état de la sonde (Figure 35).

Le dispositif expérimental utilisé en imagerie calcique comporte un microscope inversé (Zeiss®), une caméra capable d'enregistrer la fluorescence (PHOTOMETRIC CoolSNAP™ HQ²), ainsi qu'un polychromateur (Polychrome V, TILL PHOTONIC). Le polychromateur est en mesure d'émettre alternativement à 340 et 380nm de façon *quasi* simultanée, pour chaque temps, l'émission à 510 nm des sondes est enregistrée. Les données sont enregistrées grâce au logiciel MetaFluor v 6.1 (Meta Imaging Series®). Le logiciel est capable de quantifier la fluorescence émise à 510 nm par les sondes et de classer ces valeurs de fluorescences en fonctions de la longueur d'onde d'excitation utilisée.

$2,5 \cdot 10^5$ cellules destinées aux tests d'imagerie sontensemencées sur une lamelle de verre (Deckgläser, Knittel GLASS) placée dans une boîte de Petri d'un diamètre de 35mm contenant 1 mL de milieu. Les cellules sont incubées en présence de la sonde Fura-2 pendant 45 minutes à 37°C. Pour cela, chaque boîte d'imagerie est « chargée » avec 2 μ L de Fura-2 AM dilués dans le DMSO.

Le Fura-2 AM possèdent un groupement Acétyle-Méthyle (AM) rendant les molécules lipophiles et leurs permettant de passer la membrane plasmique. L'activité enzymatique des Acétyle-Méthyle Estérase intracellulaires permet le clivage des groupements AM des sondes et leur séquestration dans le cytoplasme par perte du caractère lipophile. La fluorescence enregistrée est donc strictement intracellulaire. Une fois que les cellules ont incorporé la sonde, elles sont mises en contact avec le milieu d'imagerie par dépôt de quelques gouttes au centre de la lamelle. La boîte est ensuite placée sur la platine du microscope inversé et le milieu d'imagerie est perfusé.

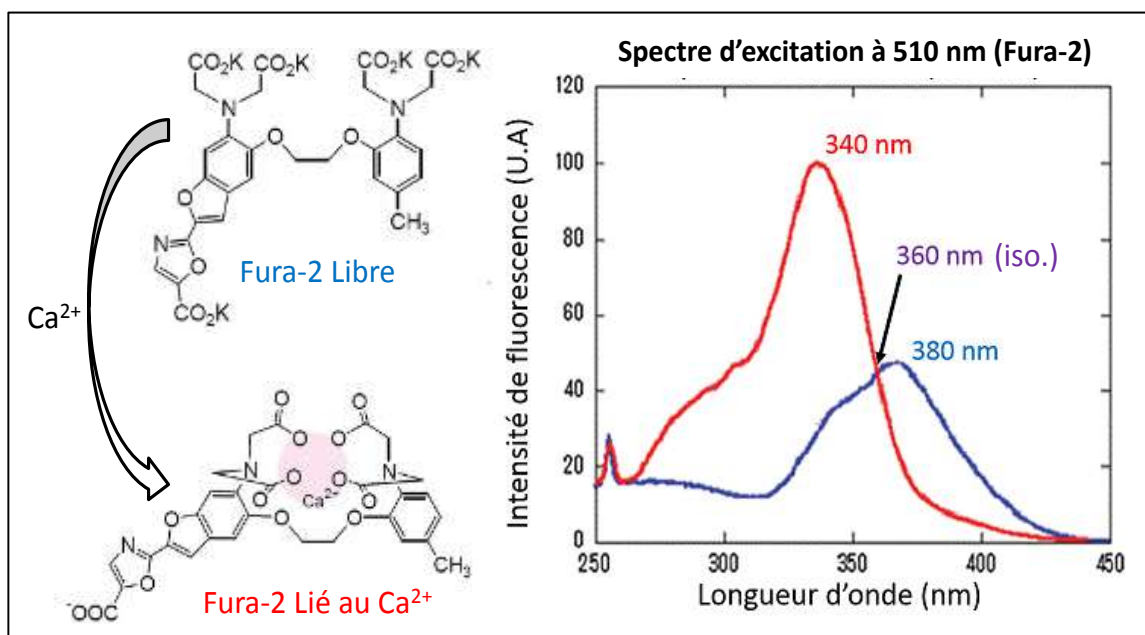


Figure 35) Structure et principe de fonctionnement de la sonde Fura-2 AM :

Schéma représentant le changement de conformation tridimensionnelle de la sonde Fura-2 AM avec la fixation du calcium. La longueur d'onde d'excitation de la sonde libre est de 380 nm contre 340 nm pour la sonde liée au calcium. Le point isobestique des deux formes est situé à 360nm. Le Fura-2 émet à une longueur d'onde de 510 nm indépendamment de la longueur d'onde d'excitation.

Modifié d'après [Kikushi *et al.* 2010].

Les différents milieux utilisés sont préparés à partir d'une solution mère d'imagerie (Tableau 6), avant d'être complétés par des solutions ioniques plus concentrées, le pH des solutions d'imagerie est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH. Les milieux à 2 mM

Ca²⁺ et 1 mM Mg²⁺ sont préparés par ajout de CaCl₂ et de MgCl₂. Une solution dans laquelle le Ca²⁺ est remplacé par du Manganèse (Mn²⁺) est également préparée.

Tableau 9 : Composition des solutions et milieux d'imagerie utilisés.

Milieux	Sels	Concentration molaire (mM)	Masse (pour 1L) (g)
Solution mère d'imagerie (0mM Ca ²⁺ / 0 mM Mg ²⁺)	NaCl	145	8,747
	KCl	5	0,373
	HEPES	10	2,383
	D-Glucose	5	0,901

A) Evaluation de la fluorescence calcique cytosolique :

Les cellules sont perfusées avec une solution d'imagerie supplémentée en CaCl₂ et MgCl₂ pour une concentration finale de 2 mM Ca²⁺ et 1mM Mg²⁺. Le logiciel MetaFluor enregistre 3 tracés :

- la fluorescence émise après stimulation à 380 nm, correspondant à la sonde libre.
- la fluorescence émise après stimulation à 340 nm, représentant la sonde liée. - le ratio de fluorescence liée/libre (F_{340/380}).

Les valeurs stables de ratio de fluorescence sont quantifiées pour chaque cellule et représenté sous forme de moyennes. La valeur moyenne du ratio de fluorescence F_{340/380} enregistrée est donc représentative de la concentration calcique libre moyenne dans le cytosol.

La fluorescence du Fura-2 (340/380 nm) est enregistrée pendant 3 minutes après stabilisation du signal pour déterminer le niveau moyen de Ca²⁺ libre dans le cytosol.

B) Evaluation de la fluorescence magnésique cytosolique :

La technique d'évaluation de la fluorescence magnésique implique l'utilisation de la sonde MagFura-2 AM. Cette sonde possède une affinité importante pour le magnésium avec un K_d de 1,9 mM. Le MagFura-2 AM possède des caractéristiques d'émission analogues au Fura-2 AM. Néanmoins ses longueurs d'ondes d'excitation sont de 350 nm pour la forme liée au magnésium et 370 nm en conformation libre. De même que pour déterminer la fluorescence calcique intracellulaire, le ratio des formes liée sur libre est quantifié pour chaque cellule. La valeur de ratio 350/370 nm du MagFura-2 permet d'évaluer la fluorescence magnésique intracellulaire et donc d'estimer le Mg^{2+} libre dans le cytosol.

2) Evaluation de l'entrée cationique par le quench au Mn^{2+} :

Le protocole d'enregistrement de l'entrée cationique permet d'« éteindre » la fluorescence de la sonde calcique Fura-2 par perfusion d'une solution dans laquelle le Mn^{2+} remplace le Ca^{2+} . En effet, le Mn^{2+} est un cation divalent qui entre dans la cellule en utilisant les mêmes voies que le Ca^{2+} . La fixation du Mn^{2+} au Fura-2 se traduit par une extinction permanente de la fluorescence de la sonde par altération de sa structure.

La sonde est stimulée à 360 nm qui est le point isobestique entre les formes libres et liées (Figure 5), cela permet de s'affranchir de la concentration calcique libre cytoplasmique et de ne percevoir que l'extinction de la fluorescence induite par le Mn^{2+} . La chute de fluorescence induite par le Mn^{2+} est représentée sous forme d'une pente, une pente forte traduit une chute importante de la fluorescence, et ainsi une entrée cationique massive (Figure 6). Durant le protocole d'enregistrement, les cellules sont perfusées pendant 1 minute avec une solution physiologique ($2Ca^{2+}/1Mg^{2+}$) puis 2 minutes avec une solution de Mn^{2+} à 2 mM et 1mM Mg^{2+} . La valeur de la pente initiale est soustraite à la valeur de la pente d'extinction (quench) médiée par le Mn^{2+} pour chaque cellule étudiée, et les résultats sont représentés sous forme d'une pente d'extinction moyenne (Figure 36).

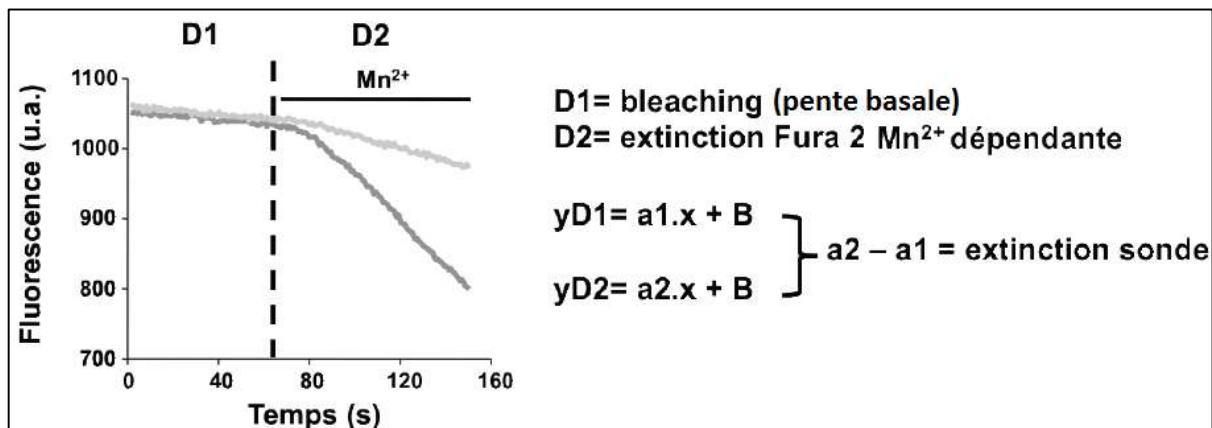


Figure 36) Calcul de la pente d'extinction du Fura-2 AM :

Représentation d'un tracé d'imagerie calcique avec le protocole d'extinction au manganèse. Le calcul de quantification de l'extinction totale est représenté à droite et permet d'estimer l'entrée cationique constitutive dans la cellule.

VI) Analyse statistique :

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm SEM (erreur standard à la moyenne). Dans la présentation des résultats, « n » correspond au nombre d'échantillons et « N » au nombre de passages testés. L'ensemble des tests statistiques est réalisé grâce au logiciel Sigma-Stat 3.0. Les variables quantitatives obtenues sont, tout d'abord analysées par un test de Kolmogorov-Smirnov afin de déterminer si elles suivent une loi normale. Si c'est le cas un test de Student est réalisé, sinon un test non-paramétrique (Mann-Whitney) sera privilégié le cas échéant. Pour les tests nécessitant de comparer plus de 2 paramètres entre eux, une analyse de variance (ANOVA) à une ou à deux voies est effectuée ainsi que des tests post-hoc (Dunn's, Tukey). Une ANOVA sur rang est pratiquée si la répartition des échantillons ne suivent pas une loi normale. Pour tous les tests statistiques effectués, un seuil de significativité de 5% ($P < 0,05$) est choisi. Tous les résultats numériques sont représentés sous formes graphiques à l'aide du logiciel Origin (Microcal).

RESULTATS et DISCUSSION :

Partie I :

Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées.

Partie 1 : Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées :

I) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des CSP :

1) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :

Afin de caractériser le modèle cellulaire faisant l'objet de nos travaux, nous avons validé l'expression de plusieurs marqueurs qui différencient les CSP des autres types cellulaires du stroma : la GFAP (Gliale Fibrillary Acidic Protein), la desmine, ainsi que la vimentine. L'expression de ce groupe de marqueurs est caractéristique des CSP indépendamment de l'état d'activation du MET (Figure 37).

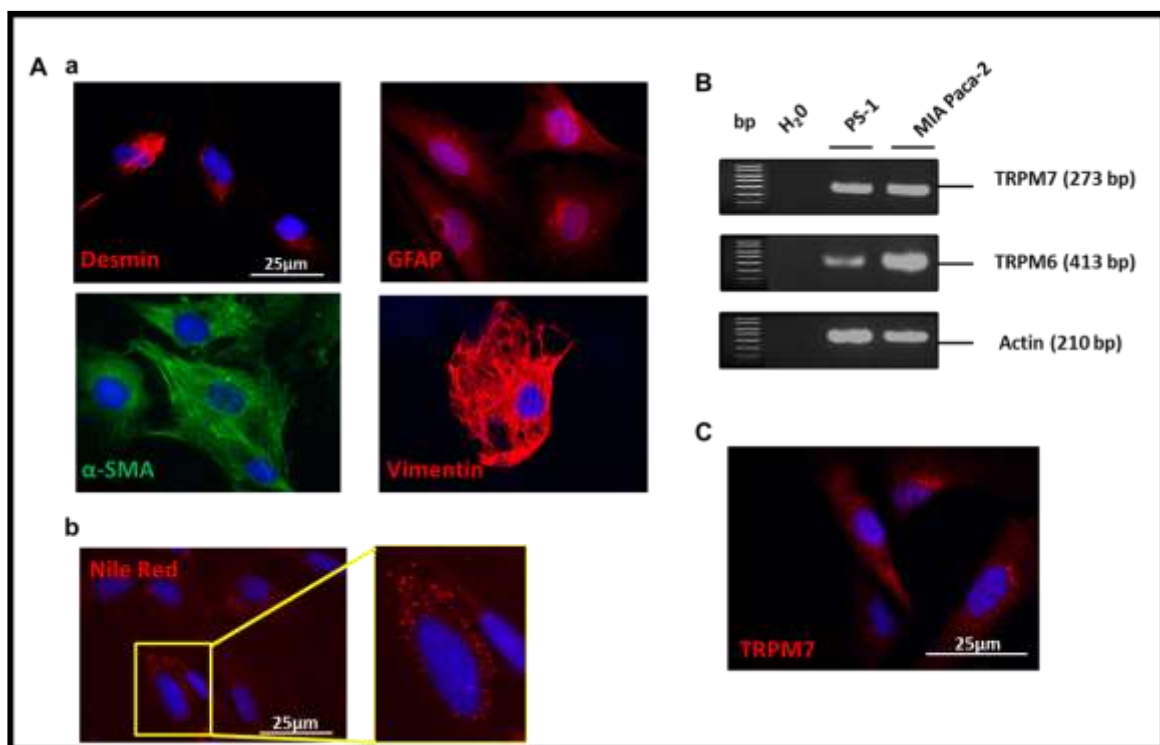


Figure 37) Caractérisation de la lignée PS-1 :

Validation de l'expression des marqueurs caractéristiques des CSP activées : Desmine, GFAP, vimentine et α -SMA par immunodétection en microscopie à fluorescence (A-a). Expression des vésicules lipidiques par marquage au Nile Red en immunofluorescence (A-b). Validation de l'expression des canaux TRPM7 et TRPM6 dans les lignées PS-1 et MIA Paca-2 par PCR (B). Localisation de l'expression du canal TRPM7 par immunofluorescence (C). N=3

Il n'existe que deux marqueurs connus à ce jour pour différencier les CSP quiescentes des CSP activées : l'état quiescent est caractérisé par la présence de vésicules lipidiques contenant le rétinol, et l'état activé par le marqueur d'activation α -SMA [Apte et al. 2002]. Nous montrons que les cellules PS-1 sont des CSP activées, confirmant les résultats de Fieke et collaborateurs. Néanmoins, aucun contrôle négatif n'a été réalisé en parallèle sur des cellules n'exprimant pas l' α -SMA.

Afin de caractériser la lignée PS-1, nous avons réalisé des marquages en microscopie à immunofluorescence pour la GFAP, la desmine, la vimentine et l' α -SMA (Figure 37-A-a). Les cellules PS-1 expriment ces 4 protéines, confirmant qu'il s'agit de CSP activées (Figure 37-A-a). Un marquage du rétinol contenu dans les vésicules lipidiques cytoplasmiques des PS-1 a également été réalisé et montre que la population cellulaire moyenne est faiblement marquée, avec de rares cellules exprimant de nombreuses vésicules (Figure 37-A-b). Les cellules PS-1 ont été caractérisées *in vitro* lors de leur extraction du pancréas humain, et Fieke et collaborateurs ont déterminé que, même après activation, environ 5% des cellules conservaient une forte expression cytoplasmique de vésicules contenant du rétinol [Fieke et al. 2009]. Il est à noter que les PS-1 sont issues d'un pancréas sain, et qu'il s'agissait de CSP quiescentes avant qu'elles ne soient activées *in vitro*. Dans ces conditions, il paraît logique, qu'en dépit de leur activation, certaines d'entre elles conservent un fort marquage vésiculaire. De plus, l'activation des CSP aboutit à une importante diminution de l'expression de ces vésicules mais pas à une disparition totale [Wehr et al. 2011]. Aussi, la présence de rares vésicules ne remet pas en question l'état activé des cellules PS-1 en culture.

Dans le but de vérifier que le canal TRPM7 est bien exprimé dans les cellules PS-1, une détection des transcrits du canal a été réalisée en PCR. L'expression des transcrits du canal TRPM6 a également été étudiée. Les résultats montrent que les deux canaux sont exprimés dans les cellules PS-1 (Figure 37-B). Les cellules MIA Paca-2 sont utilisées comme contrôle positif, puisqu'elles sont connues pour exprimer ces deux canaux, et que le rôle du canal TRPM7 a déjà été étudié dans ce modèle cellulaire [Rybarczyk et al. 2012 et 2017]. Nous avons démontré que les cellules PS-1 expriment les transcrits des deux canaux. Un marquage de TRPM7 a

également été réalisé en microscopie à immunofluorescence, et révèle une localisation périnucléaire du canal dans les cellules PS-1 (Figure 37-C).

Le canal TRPM7 est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme et nous nous attendions à ce qu'il soit exprimé dans les cellules PS-1. En revanche, le canal TRPM6 présente un mode d'expression organe dépendant, et n'est exprimé physiologiquement que dans les entérocytes du colon et dans les cellules rénales du tube contourné distal [DeBaaje *et al.* 2015]. Le canal TRPM6 est également exprimé dans certaines tumeurs, notamment l'ACP et le cancer du sein, avec une expression retrouvée dans les cellules cancéreuses MIA Paca-2 et MCF-7 respectivement [Guilbert *et al.* 2009 ; Rybarczyk *et al.* 2017]. Il est, par conséquent étonnant de retrouver l'expression du canal TRPM6 dans les cellules PS-1. Néanmoins, le canal TRPM6, tout comme TRPM7, est impliqué dans le maintien de l'homéostasie magnésique [Chubaov *et al.* 2016].

Le processus d'activation des CSP est caractérisé par une augmentation importante de la prolifération cellulaire, et le canal TRPM7 est un acteur connu de la prolifération cellulaire. Afin de vérifier le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1, nous avons utilisé une approche par invalidation du canal TRPM7 par transfection des cellules avec un siRNA (Figure 38).

Les résultats ne montrent aucune variation significative de l'expression du canal TRPM6 24h après transfection du siTRPM7. L'utilisation du siTRPM7 permet donc de réduire l'expression de TRPM7 sans influencer celle du canal TRPM6.

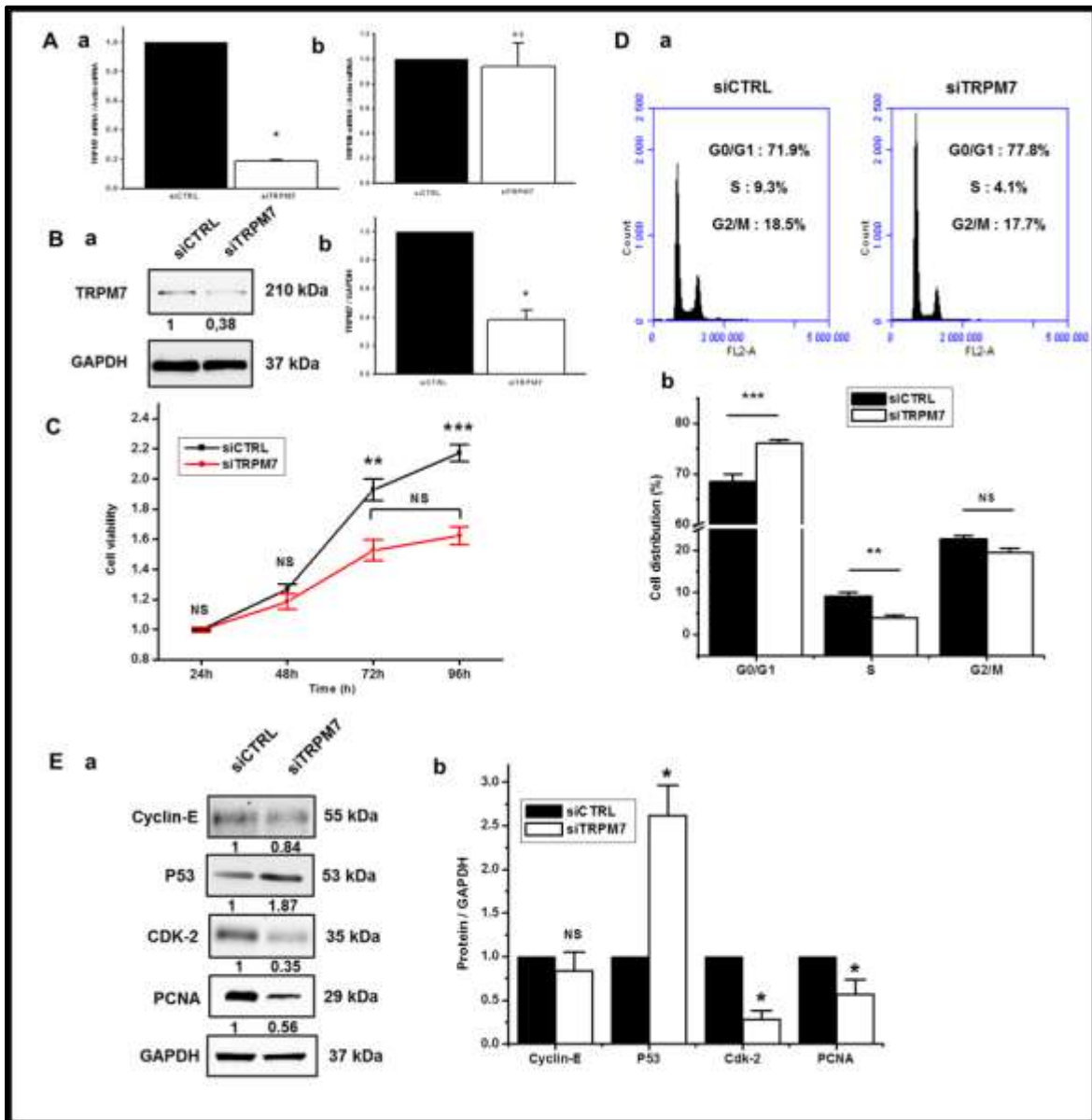


Figure 38) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :

Validation, par PCR de l'inhibition de l'expression des ARNm de TRPM7, 24h post transfection (A-a) ainsi que de TRPM6 (A-b). Western Blot présentant l'effet du siTRPM7 sur l'expression de la protéine TRPM7 (B-a) et quantification de l'expression protéique de TRPM7 48h post transfection (B-b). Cinétique de viabilité cellulaire des cellules PS-1 en fonction du siRNA utilisé mise en évidence par test au MTT (C). Profils de cycle cellulaire en fonction du nombre de cellules analysées en cytométrie de flux (D-a) et quantification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire 72h post transfection (D-b). Western blot représentant le niveau relatif d'expression des protéines du cycle (E-a) et quantification de l'expression des protéines normalisée sur la GAPDH, 72h post transfection (E-b). N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La transfection des cellules par un siRNA a été validée par PCR, où l'on constate une diminution de l'expression des transcrits de TRPM7 de 82% (siTRPM7 : 0.18 ± 0.01 contre siCTRL) 24h après la transfection des cellules avec le siTRPM7 comparé aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle (siCTRL) (Figure 38-A-a). L'expression des transcrits du canal TRPM6 a également été quantifiée par PCR 48h après la transfection du siTRPM7. Aucune variation significative de l'expression des transcrits du canal TRPM6 n'est perceptible dans les cellules transfectées avec le siTRPM7 (siTRPM7 : 0.93 ± 0.19 contre siCTRL : 1.00) (Figure 38-A-b). Le niveau d'expression de la protéine TRPM7 a également été quantifié par Western blot 48h après transfection. L'expression du canal TRPM7 diminue de près de 62% avec le siTRPM7 (siTRPM7 : 0.38 ± 0.08 contre siCTRL : 1.00), comparé aux cellules contrôles (transfectées avec le siCTRL (Figure 38-B).

Après avoir validé l'efficacité du siTRPM7, la viabilité des cellules a été évaluée par métabolisation du MTT, au cours d'une cinétique de croissance cellulaire de 96h (Figure 38-C). Les résultats obtenus montrent une diminution de la viabilité cellulaire à 72h (siTRPM7 : 1.52 ± 0.06 contre siCTRL : 1.92 ± 0.07) et 96h (si TRPM7 : 1.62 ± 0.05 contre siCTRL : 2.17 ± 0.05) après la transfection du siTRPM7 en comparaison avec les cellules contrôles (Figure 38-C). Aucune différence significative n'est perçue entre les deux conditions 24h (si TRPM7 : 1.00 ± 0.01 contre siCTRL : 0.99 ± 0.00) et 48h (si TRPM7 : 1.18 ± 0.06 contre siCTRL : 1.23 ± 0.03) après la transfection des cellules avec le siCTRL et le siTRPM7 (Figure 38-C).

La diminution de la viabilité cellulaire globale peut être reliée à une baisse de la prolifération cellulaire comme à une hausse de la mortalité. Afin de confirmer que l'effet du siTRPM7 sur la viabilité des cellules PS-1 est lié à la prolifération, des tests d'analyse du cycle cellulaire utilisant la technique de cytométrie en flux ont été réalisés 72h après transfection (Figure 38-D). La cinétique de viabilité cellulaire précédemment réalisée a permis de déterminer que le siTRPM7 induit une baisse de la viabilité des cellules PS-1 72h après transfection et atteint son maximum à 96h (Figure 38-C). Le cycle cellulaire est donc évalué à 72h, temps auquel l'inhibition de la prolifération cellulaire est amorcée et se poursuit jusqu'à 96h.

Les résultats obtenus montrent une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire d'environ 8% (si TRPM7 : $77.47 \pm 0.84\%$ contre

siCTRL : $68.43 \pm 2.70\%$), ainsi qu'une diminution du pourcentage de cellules en phase S de 5% (si TRPM7 : $4.12 \pm 0.51\%$ contre siCTRL : $9.4 \pm 1.25\%$), lorsqu'elles sont transfectées avec le siTRPM7. La transfection avec le siTRPM7 n'influence pas le pourcentage de cellules situées dans la phase G2/M du cycle cellulaire (si TRPM7 : $17.74 \pm 0.97\%$ contre siCTRL : $18.51 \pm 0.85\%$) (Figure 38-D-b).

Dans le but de confirmer les effets de la transfection avec le siTRPM7 sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire l'expression des protéines impliquées dans la transition G1-S a été analysée par western blot à $t=72h$ après la transfection des cellules. L'expression des protéines P53, régulateur du cycle cellulaire et notamment du point de restriction ; de PCNA ainsi que de la cycline-E et de la CDK2, toutes 3 impliquées dans la transition G1-S a été évalué (Figure 38-E).

Les résultats montrent une augmentation de l'expression du facteur P53 d'environ 160% (si TRPM7 : 2.61 ± 0.35 contre siCTRL : 1.00), ainsi qu'une réduction de l'expression de PCNA de 44% (si TRPM7 : 0.56 ± 0.17 contre siCTRL : 1.00), et de la CDK2 d'environ 72% (si TRPM7 : 0.28 ± 0.09 contre siCTRL : 1.00), 72h après transfection avec le siTRPM7 et en comparaison avec les cellules transfectées avec le siCTRL. Les résultats ne montrent aucune variation significative de l'expression de la cycline E (siTRPM7 : 0.84 ± 0.21 contre siCTRL : 1.00) (Figure 38-E-b).

Les résultats obtenus montrent une diminution de la viabilité cellulaire induite par le siTRPM7. L'effet perçut sur la viabilité est due à l'accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire accompagné d'une diminution du pourcentage de cellules en phase S. L'inhibition de la transition G1-S semble liée à l'augmentation de l'expression de P53 induisant une diminution de l'expression de la CDK2 et de PCNA. Il est a noter que l'expression de la cycline E ne varie pas.

Il a été démontré que l'expression du canal TRPM7 augmente de façon importante uniquement pendant la phase G1 du cycle cellulaire, suggérant qu'il puisse être impliqué dans la transition vers la phase S [Tani *et al.* 2007]. Il a également été démontré que le canal TRPM7 régule la transition G1-S dans les cellules de rétinoblastome [Hanano *et al.* 2004] et de cancer de la vessie [Cao *et al.* 2016].

La cycline E, la CDK2 et PCNA sont connus pour être régulés négativement par le facteur P53. Nos résultats ne montrent aucune variation de l'expression de la cycline E, la transition en phase S étant liée à l'association du complexe actif CDK2/cycline E, la régulation de la CDK2 uniquement est suffisante pour induire un blocage en phase G0/G1. L'expression de la cycline E ne varie pas avec l'utilisation du siTRPM7, seul l'expression de CDK2 et PCNA sera prise en compte pour valider un blocage de la transition G1-S au cours des analyses du cycle cellulaire complémentaires.

Afin de confirmer le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1, nous avons utilisé un inhibiteur du canal, le NS8593 (Figure 39).

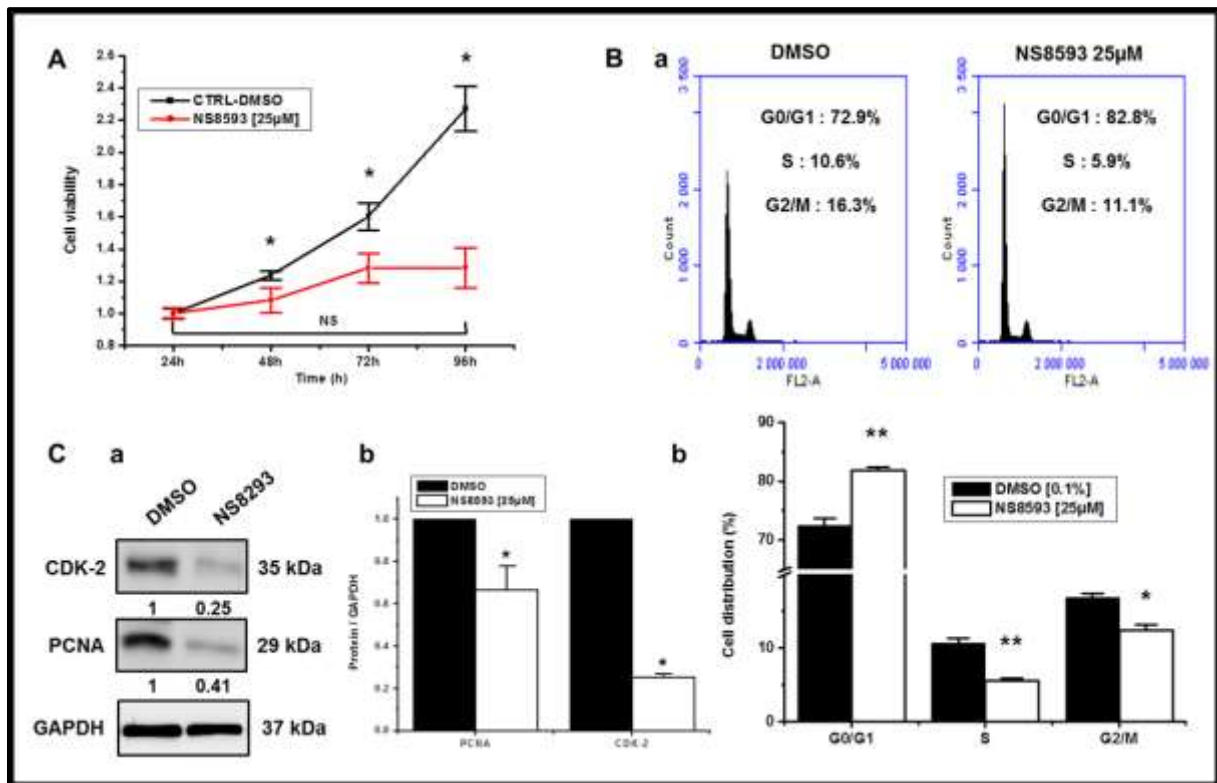


Figure 39) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 :

Cinétique de viabilité cellulaire au MTT des cellules PS-1, en fonction du traitement au NS8593 ou avec le solvant seul (A). Profils de cycle cellulaire en cytométrie de flux des cellules PS-1 en fonction du traitement avec l'inhibiteur pharmacologique du canal TRPM7 (B-a) et quantification de la répartition cellulaire dans les phases du cycle à t=72h (B-b). Western blot représentant l'expression des protéines CDK-2 et PCNA avec et sans traitement au NS8593 (C-a) et quantification de l'expression de ces protéines sur l'expression de la GAPDH à t=72h (C-b). N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Les cellules ont été traitées avec 25 μM de NS8593 pendant une durée de 72h et la viabilité cellulaire a été quantifiée par test au MTT (Figure 39-A). L'inhibition du canal par le NS8593 à une concentration de 25 μM induit une diminution significative de la viabilité cellulaire dès 48h (NS8593 : 1.08 ± 0.07 contre le contrôle DMSO 1.23 ± 0.02) (Figure 39-A). La diminution de la viabilité cellulaire est amplifiée à 72h (NS8593 : 1.28 ± 0.09 contre le contrôle DMSO 1.60 ± 0.02) et 96h (NS8593 : 1.28 ± 0.12 contre le contrôle DMSO 2.27 ± 0.14). Le traitement au NS8593 empêche également que la viabilité cellulaire n'augmente au cours du temps, il n'y a pas de différence significative de viabilité cellulaire entre 24h et 96h (24h NS8593 : 1.00 ± 0.03 contre 96h NS8593 : 1.28 ± 0.12) contrairement à la condition contrôle DMSO (24h DMSO : 1.00 ± 0.02 contre 96h DMSO : 2.27 ± 0.14) (Figure 39-A).

L'exploration du cycle cellulaire par cytométrie de flux montre une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 d'environ 10% (NS8593 : $82.81 \pm 1.27\%$ contre DMSO : $72.93 \pm 3.04\%$), une diminution du pourcentage de cellules en phase S de 4% (NS8593 : $5.92 \pm 0.87\%$ contre DMSO : $10.75 \pm 1.10\%$), et en phase G2/M de 5% environs (NS8593 : $11.17 \pm 0.94\%$ contre DMSO : $16.30 \pm 1.04\%$) (Figure 39-B).

Dans le but de confirmer le blocage en phase G0/G1 du cycle cellulaire induit par un traitement au NS8593, l'expression des protéines PCNA et CDK2, connues pour diminuer 72h après transfection avec le siTRPM7, a été quantifiée (Figure 39-C). Le traitement avec 25 μM de NS8593 pendant 48h provoque une diminution de l'expression de PCNA d'environ 35% (NS8593 : 0.66 ± 0.11 contre le contrôle DMSO : 1.00) accompagnée d'une baisse du niveau d'expression de la CDK2 de 75% (NS8593 : 0.25 ± 0.01 contre le contrôle DMSO : 1.00) (Figure 39-C-b).

Des résultats similaires sur la viabilité et la prolifération sont obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique du canal TRPM7. L'utilisation du NS8593 induit un arrêt de la viabilité des cellules PS-1 entre 24 et 96h contrairement au siTRPM7 aux effets plus modérés (Figure 38-C). En effet le NS8593 est utilisé la concentration de 25 μM dans nos travaux. Cette inhibiteur pharmacologique possède une IC_{50} pour le canal TRPM7 de 1,6 μM et a été utilisé dans la littérature une concentration similaire [Davis *et al.* 2014]. Nous souhaitons utiliser le NS8593 à une forte concentration afin d'induire un effet inhibiteur supérieur à l'effet de l'invalidation du canal par le

siTRPM7. Ainsi nos résultats semblent indiquer que l'activité du canal TRPM7 est indispensable au maintien de la viabilité cellulaire dans les cellules PS-1.

Le NS8593 induit également un blocage du cycle en phase G0/G1 lié à une diminution de l'expression de CDK2 et PCNA (Figure 39-B et C) et. Bien que le niveau d'expression de P53 n'ait pas été quantifié avec l'inhibition pharmacologique de TRPM7, l'activité de MDM2 a été investiguée par la suite dans la condition traitée avec le NS8593.

2) Rôle du facteur p53 dans la prolifération des cellules PS-1 :

Le rôle de P53 dans la prolifération des cellules PS-1 a été confirmé par l'utilisation de la nutlin3a connue pour empêcher l'interaction P53/MDM2 et donc la dégradation de P53 (Figure 40). Cet outil pharmacologique permet de mimer une augmentation importante de P53, et ainsi d'imiter l'effet du siTRPM7.

Le traitement avec la nutlin3a induit une forte diminution de l'expression de la CDK2 et de PCNA (Figure 40-C) avec une inhibition très importante du pourcentage de cellules en phase S (Figure 40-B). L'inhibition de la dégradation de P53 par la nutlin3a a été vérifiée *via* la quantification de l'expression de P53 ainsi que de son régulateur P-MDM2 (Figure 40-C).

La très forte diminution du pourcentage de cellules en phase S n'est pas accompagnée d'une accumulation des cellules en phases G0/G1. Au cours des expérimentations impliquant le siTRPM7, l'expression de P53 est multiplié par 2 (Figure 38-E), lorsque les cellules sont traitées avec la nutlin3a, le facteur P53 voit son expression décuplée (Figure 40-C).

P53 agit au cours de toutes les phases du cycle cellulaire, il est possible qu'en cas de très forte concentration de P53 il y ait un fort blocage en phase G0/G1 tout comme en phase G2/M, ce qui pourrait expliquer l'absence d'accumulation des cellules en phase G0/G1 (les cellules étant reportées équitablement sur les deux phases).

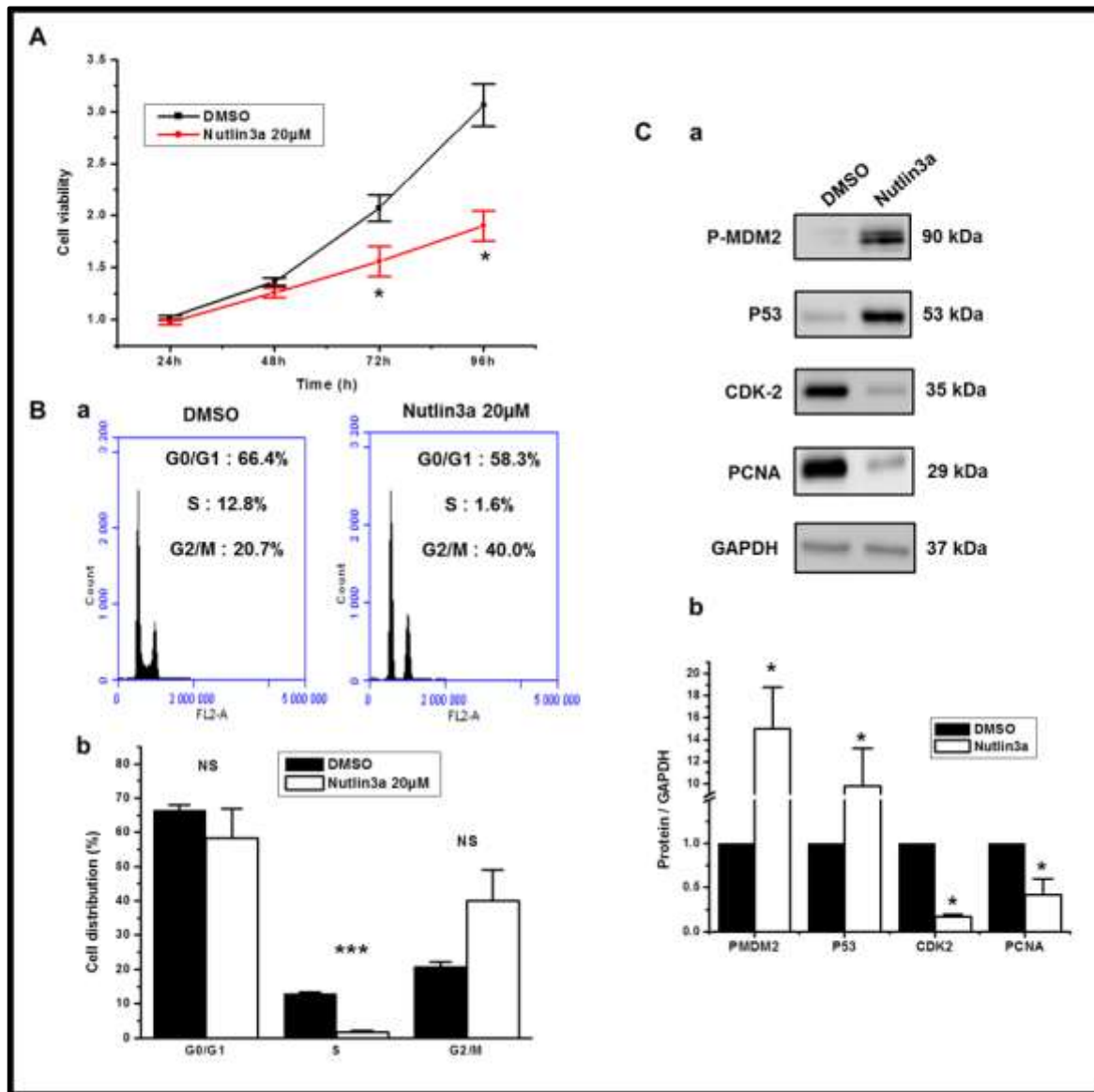


Figure 40) Rôle de P53 dans la prolifération des cellules PS-1 :

Cinétique de viabilité cellulaire au MTT des PS-1 avec traitement à la nutlin3a ou DMSO seul ; N=3 (A). Profils de cycle cellulaire des cellules PS-1 en fonction du traitement à la nutlin3a (B-a) et quantification de la répartition des cellules dans les phases du cycle à t=72h ; N=3 (B-b). Western blot présentant l'expression des protéines P-MDM2, P53, CDK-2 et PCNA (C-a) et quantification de l'expression de ces protéines par rapport à la GAPDH à t=72h ; N=4 (C-b). NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Ces résultats confirment que P53 est impliqué dans la prolifération des cellules PS-1 et agit en aval du canal TRPM7 sur l'expression de CDK2 et PCNA.

P53 est connu pour être régulé par la protéine MDM2, étant elle-même influencée par l'activation de voies de signalisations tel que PI3K/AKT ou encore mTOR

[Carnero et Paramio 2014]. D'autre part le canal TRPM7 est connu pour influencer la prolifération cellulaire en régulant les voies PI3K et ERK dans les CSH [Fang et al. 2013].

3) Implication de la voie PI3K/AKT dans la prolifération des cellules PS-1 :

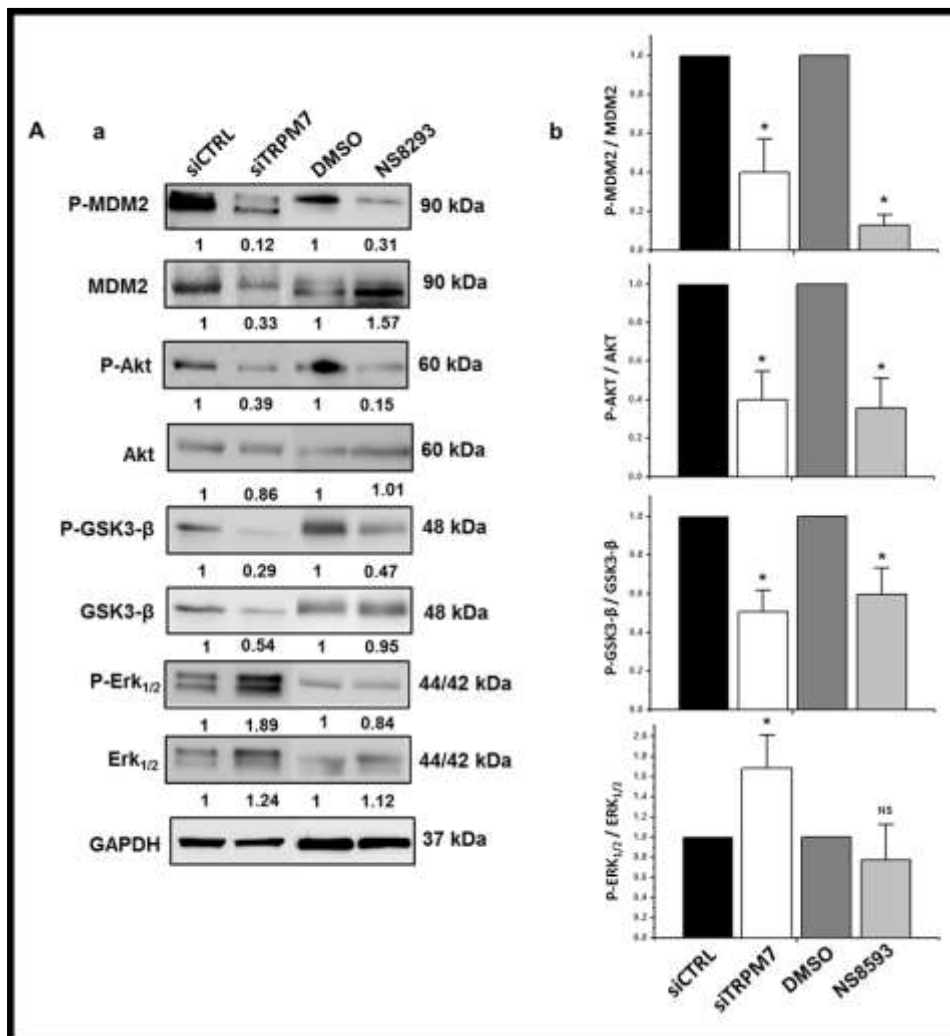


Figure 41) Rôle du canal TRPM7 sur la signalisation proliférative dans les cellules PS-1 :

Western blot représentant l'expression des protéines MDM2, Akt, GSK3-β et ERK_{1/2} ainsi que de leur formes phosphorylées respectives en fonction du siRNA transfectés ou de l'utilisation du NS8593 (A-a). Quantification du ratio d'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées des protéines citées, en fonction du siRNA ou de l'inhibition pharmacologique du canal TRPM7 72h post transfection ou après 48h de traitement (A-b). N=4 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

Nous avons donc vérifié le niveau d'activation des voies mitotiques PI3K/AKT et ERK (Figure 41). Nos résultats montrent que le canal TRPM7 régule l'activation de la voie PI3K/AKT ainsi que des cibles d'AKT, GSK3- β et MDM-2 (Figure 41). La phosphorylation de MDM-2 sur S166 par AKT permet d'augmenter son affinité pour P53 et facilite la dégradation de ce dernier. La phosphorylation de GSK3- β sur S9 par AKT bloque le site de liaison de GSK3- β à ces éventuels substrats et l'inactive. GSK3- β est connu pour inhiber la prolifération cellulaire et favoriser l'apoptose lorsqu'il est sous forme non phosphorylé, en régulant principalement des acteurs de la transition G1-S tel que les cyclines E et D [Maurer *et al.* 2014]. Par conséquent nos résultats suggèrent que le canal TRPM7 favorise la prolifération cellulaire par la voie PI3K/AKT en permettant l'inhibition de GSK3- β et la dégradation de P53. Les effets de l'inactivation comme de l'inhibition pharmacologique de TRPM7 sur l'activation de la voie PI3K/AKT sont semblables (Figure 41).

D'autres parts, nos résultats indiquent un potentiel régulation négative de la voie ERK1/2 par le canal TRPM7, dont le niveau d'activation augmente lorsque TRPM7 est invalidé par siRNA mais pas lorsque celui-ci est inhibé par le NS8593 (Figure 41).

Il a été démontré que l'inactivation du canal TRPM7 induit un blocage en phase G0/G1 du cycle cellulaire accompagné d'une diminution de l'expression de CDK2, d'une baisse de l'activation de la voie PI3K/AKT ainsi que d'une augmentation de P-ERK1/2 dans les cellules de cancer de la vessie BCa [Cao *et al.* 2016].

D'autres travaux démontrent l'existence d'un phénomène de régulation négative de la voie ERK1/2 par le canalyon TRPM7. Il a notamment été démontré que l'inhibition du canal TRPM7 favorise l'hypertension artérielle pulmonaire *via* l'activation de la voie ERK1/2 dans les CMLV [Xing *et al.* 2019]. De plus, l'inactivation du canal TRPM7 favorise la prolifération des cellules endothéliales vasculaire également par l'activation de la voie ERK [Inoue *et al.* 2009].

Nos résultats démontrent un phénomène similaire à celui décrit dans la littérature, concernant la régulation négative de la voie ERK. Néanmoins, ces résultats ne sont pas obtenus lorsque le canal est inhibé avec le NS8593. Le NS8593 n'est pas spécifique du canal TRPM7, il est utilisé dans le cadre de nos travaux à la concentration de 25 μ M et touche également, à cette concentration, les canaux SK ainsi que le canal TRPM6 [Davis *et al.* 2014 ; Shen *et al.* 2014]. Il est probable que

l'inhibition combinée de plusieurs canaux potentiellement régulateurs de ERK, abolisse l'effet inhibiteur de TRPM7 sur la voie ERK. Ainsi, l'inhibition combinée d'un régulateur négatif et d'un activateur peut aboutir à l'absence de modification de l'activation de ERK observée sur les cellules traitées au NS8593. Il est à noter que le NS8593 inhibe le canal TRPM7 par interaction de ses cycles aromatique avec le pore du canal [Davis *et al.* 2014 ; Shen *et al.* 2014]. Aussi, la fonction enzymatique intracellulaire du canal ne devrait pas être influencée par la fixation de l'inhibiteur. L'absence d'activation de la voie ERK par le NS8593 dans les cellules PS-1 pourrait suggérer que le canzyne TRPM7 inhibe l'activation de la voie ERK *via* son domaine kinase.

Ces résultats montrent que l'invalidation du canal TRPM7 augmente l'activation de ERK1/2 et que l'invalidation ou l'inhibition du canal diminuent l'activation de la voie PI3K/AKT.

Afin de confirmer l'implication de la voie PI3K/AKT dans la prolifération cellulaire induite par TRPM7 dans les cellules PS-1, nous avons utilisé la wortmannine connue pour inhiber la PI3K (Figure 42).

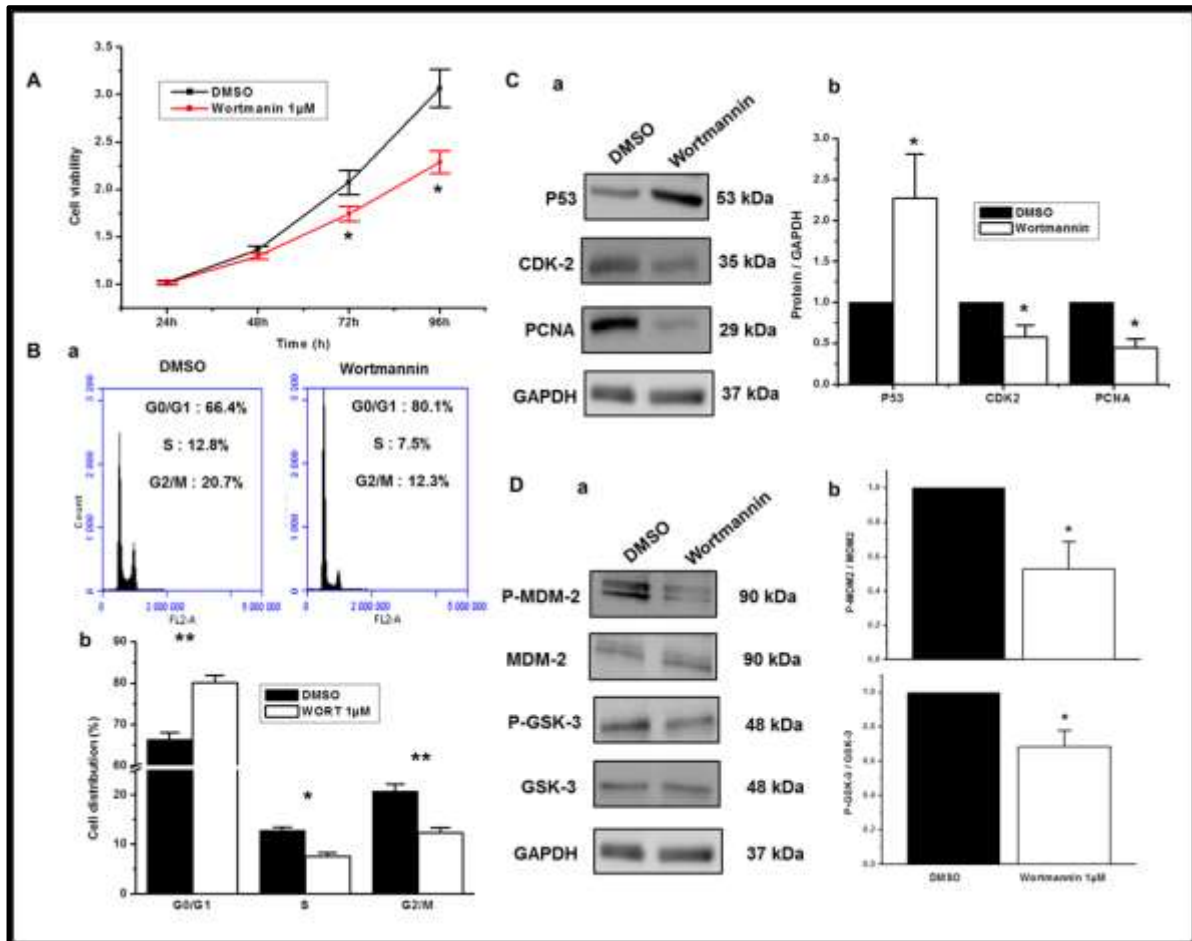


Figure 42) Rôle de la voie PI3K/AKT dans la prolifération des cellules PS-1 :

Cinétique de viabilité des cellules PS-1 en fonction du traitement à la wortmannine (A). Profils de cycle cellulaire des cellules PS-1 traitées ou non à la wortmannine (B-a) et quantification de la répartition cellulaire dans les phases du cycle en fonction du traitement à t=72h (B-b). Western blot représentant l'expression relative des protéines P53, CDK-2 et PCNA en fonction du traitement à la wortmannine (C-a) et quantification de l'expression de ces protéines par rapport à la GAPDH à t=72h (C-b). Western blot présentant l'expression relative des formes natives et phosphorylées de MDM2 et GSK3 en fonction du traitement à la wortmannine (D-a) et quantification du ratio d'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées de ces protéines à t=72h (D-b). N=3 ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Nos résultats montrent que cultiver les cellules PS-1 avec la wortmannine induit un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Figure 42-B), accompagné d'une augmentation de l'expression de P53 et d'une diminution de l'expression de PCNA et CDK2 (Figure 42-C). L'effet de la wortmannine est validé sur deux des principales cibles de la kinase AKT : MDM2 et GSK3, dont le niveau de phosphorylation diminue suite au traitement avec la wortmannine (Figure 42-D).

L'utilisation de la wortmannine, induit des effets similaires à l'inactivation / inhibition du canal TRPM7 sur la prolifération des cellules PS-1 confirmant l'implication de la voie PI3K/AKT dans ce processus, ainsi que le rôle déclencheur de TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1.

Nos résultats montrent que le canal TRPM7 régule la prolifération cellulaire *via* l'activation de la voie PI3K/AKT influençant p53 et GSK3- β . Cependant le mécanisme d'action du canal TRPM7 reste indéterminé.

Le chanzyme TRPM7 peut être impliqué dans la prolifération cellulaire des PS-1 *via* deux fonctions. Tout d'abord, la fonction enzymatique du chanzyme connu pour réguler des mécanismes tels que l'apoptose et la migration cellulaire [**Krapivinsky et al. 2014 ; Lin et al. 2015**]. Néanmoins la kinase de TRPM7 n'a jamais été étudiée dans le cadre du processus prolifératif. D'autre part, le canal TRPM7 est connu pour réguler la prolifération cellulaire *via* sa fonction canal et principalement par des conductances calciques et magnésiques [**Yee et al. 2011 ; Abed et al. 2007**].

4) Rôle du magnésium dans la prolifération des cellules PS-1 :

Afin de caractériser le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1 nous avons évalué son influence sur l'entrée cationique, l'homéostasie calcique et magnésique (Figure 43). Nos résultats d'imagerie cationique révèlent que le canal TRPM7 est impliqué dans l'entrée cationique et régule la concentration magnésique intracellulaire dans les cellules PS-1 (Figure 43).

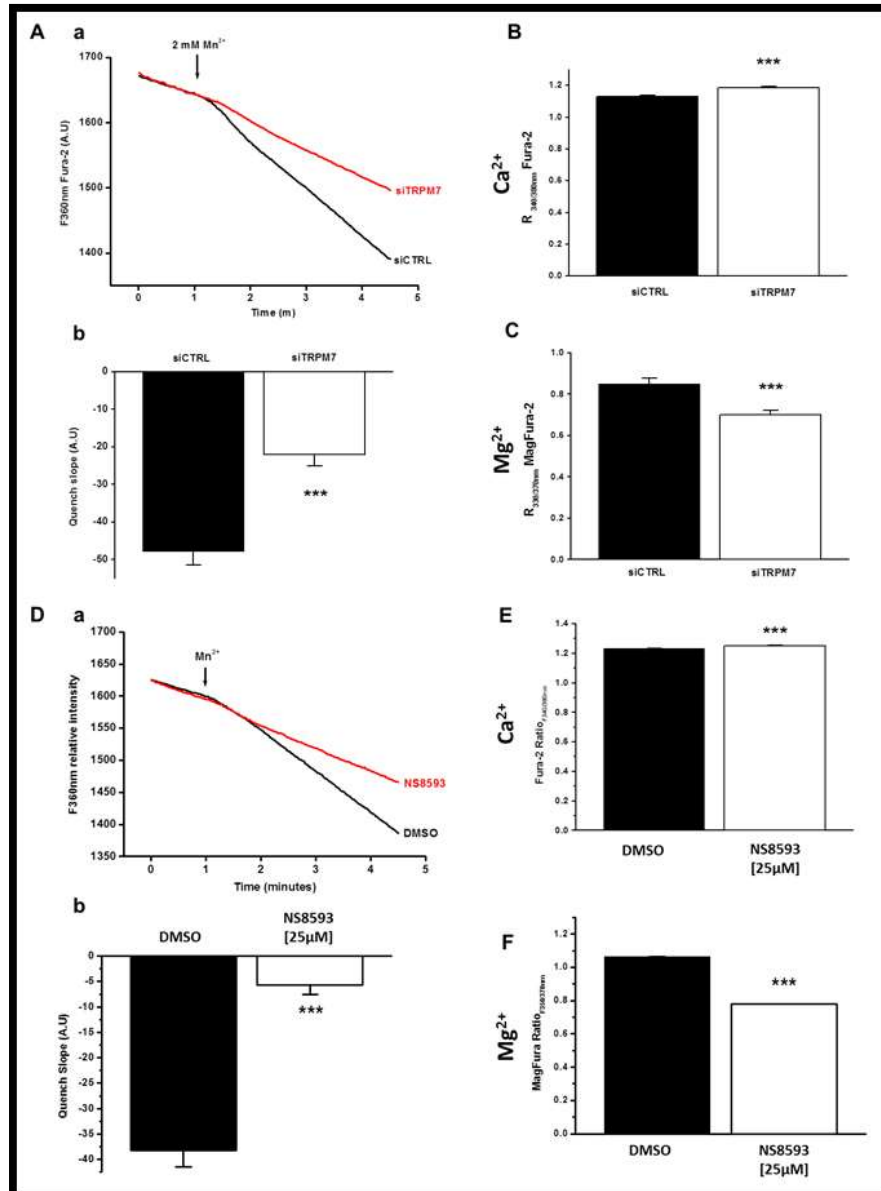


Figure 43) Rôle du canal TRPM7 dans l'entrée cationique, et le maintien de l'homéostasie calcique et magnésique dans les cellules PS-1 :

Pentes d'extinction de la fluorescence à 360nm du Fura-2 dans les cellules PS-1 transfectées avec le siTRPM7 ou le siCTRL (A-a) et quantification de la pente d'extinction de fluorescence dans les mêmes conditions (A-b). Quantification du ratio de fluorescence de la sonde Fura-2 en fonction du siRNA transfecté (B). Quantification du ratio de fluorescence du MagFura-2 en fonction du siRNA transfecté (C). Pentes d'extinction de la fluorescence à 360nm du Fura-2 dans les cellules PS-1 traitées avec le NS8593 ou le DMSO seul (D-a) et quantification de la pente d'extinction de fluorescence dans les mêmes conditions (D-b). Quantification du ratio de fluorescence de la sonde Fura-2 en fonction du traitement avec le NS8593 (E). Quantification du ratio de fluorescence du MagFura-2 en fonction du traitement avec le NS8593 (F). Réalisé 48h post transfection ou après 24h de traitement ; N=3 ; *** $p < 0.001$.

Il a été démontré que le canal TRPM7 régule l'influx cationique dans les cellules, il est perméable au calcium ainsi qu'au magnésium, et ces deux cations sont connus pour être impliqués dans la prolifération cellulaire [Zou *et al.* 2019]. Nos résultats confirment l'implication du canal TRPM7 dans l'entrée cationique et la régulation du magnésium intracellulaire. De plus, la réduction de l'entrée de cation induite par le siTRPM7 permet de confirmer la localisation membranaire du canal dans les cellules PS-1.

Il a également été démontré que lorsque l'expression du canal TRPM7 diminue, d'autres canaux magnésiques tel que MagT1 voient leur expression régulé positivement afin de maintenir l'homéostasie magnésique dans la cellule [Cazzaniga *et al.* 2017 ; Deason-Towne *et al.* 2011]. La diminution de la fluorescence magnésique intracellulaire que nous observons démontre qu'un tel mécanisme n'est pas mis en place, ou, tout du moins, que la compensation ne permet pas le recouvrement de la fluorescence magnésique contrôle dans les cellules PS-1. Nos résultats démontrent que le canal TRPM7 est le principale régulateur de l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1 et que son inhibition / invalidation génère une diminution du magnésium intracellulaire (Figure 43).

Le canal TRPM7 étant également perméable au calcium, nous avons donc mesuré la fluorescence calcique des cellules PS-1. Les résultats montrent une légère augmentation de la fluorescence calcique intracellulaire traduisant une faible élévation de la concentration calcique cytosolique (Figure 43-B et E). Il est à noter que le magnésium est le principale antagoniste du calcium et que le canal TRPM7 est d'avantage sélectif pour le magnésium qu'il ne l'est pour le calcium [Monteilh-Zoller *et al.* 2003]. Ainsi, l'invalidation ou l'inhibition du canal TRPM7 influence d'avantage le magnésium que le calcium intracellulaire. De plus, il est probable que la diminution de la concentration magnésique intracellulaire favorise l'élévation de la concentration calcique, les ions calcium venant remplacer les ions magnésiums.

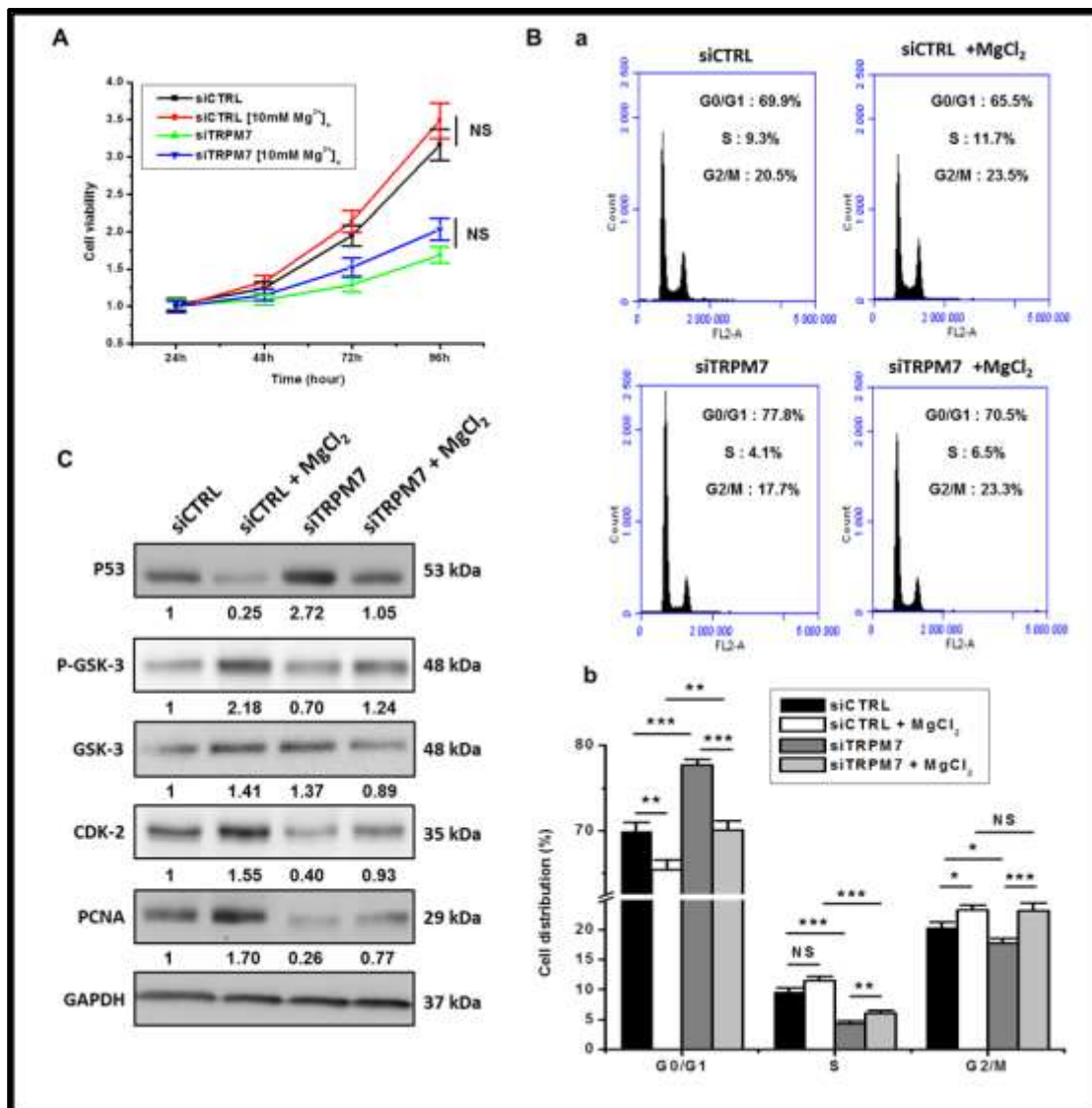


Figure 44) Effet du magnésium sur la prolifération cellulaire dépendante de TRPM7 dans les cellules PS-1 :

Cinétique de viabilité des cellules PS-1 en fonction de la transfection et de la concentration magnésique extracellulaire; N=3 (A). Profils de cycle cellulaire des cellules PS-1 en fonction du siRNA employé et de la concentration en magnésium extracellulaire (B-a) et quantification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire dans les mêmes conditions, 72h post transfection ; N= 4 (B-b). Western blot présentant l'expression relative des protéines P53, GSK3- β (et phospho GSK3- β), CDK2 et PCNA, par rapport à la GAPDH dans les cellules PS-1 en fonction de la transfection et de la concentration de magnésium extracellulaire, 72h post transfection ; N=2 (C). NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Nous avons démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie magnésique intracellulaire dans les cellules PS-1 (Figure 43). De plus le magnésium est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, et influence principalement la transition G1-S [DeBaaje *et al.* 2015].

Nous avons donc cherché à confirmer l'implication du magnésium dans le processus de prolifération cellulaire dépendant du canal TRPM7 en cultivant les cellules PS-1 dans un milieu contenant 10 mM MgCl₂.

Les résultats impliquant une supplémentation magnésique extracellulaire montrent un effet compensatoire de l'invalidation de TRPM7 sur la prolifération cellulaire. Le magnésium permet de diminué l'accumulation des cellules PS-1 en phase G0/G1 induite par le siTRPM7 et semble réguler l'expression de P53, CDK2 et PCNA ainsi que l'inactivation de GSK-3 (Figure 44-C).

Néanmoins, la supplémentation magnésique ne permet pas d'augmenter la viabilité cellulaire des cellules transfectées avec le siTRPM7. Il est possible que le magnésium favorise la prolifération et induise l'apoptose en parallèle, annulant ainsi l'effet prolifératif par une diminution de la survie des cellules PS-1. Il a été démontré qu'un influx de magnésium favorise l'apoptose cellulaire par la voie mitochondriale dans les hépatocytes de rat [Patel *et al.* 1994] et est indispensable au développement de l'apoptose induite par la voie Fas sur les cellules T [Chien *et al.* 1999]. Les résultats de quantification de l'apoptose cellulaire réalisés en condition de supplémentation magnésique révèlent effectivement une augmentation importante de la mortalité cellulaire (Figure 58-F). L'effet sur l'apoptose induite par le magnésium dépend de l'invalidation du canal TRPM7 et n'est pas perceptible en condition contrôle (Figure 58-F). Ces résultats suggèrent que le calcium pourrait être impliqué dans l'apoptose induite par la supplémentation magnésique.

Le magnésium est connu pour être le principal antagoniste du calcium dans la cellule, et le canal TRPM7 présente une sélectivité plus importante pour le magnésium que pour le calcium [Monteilh-Zoller *et al.* 2003]. C'est pourquoi, il est probable que les cellules cultivées dans un milieu contenant 10 mM de magnésium présentent une diminution de la concentration calcique intracellulaire. Et que l'influx

calcique médié par le canal TRPM7 soit fortement inhibé par le magnésium en raison de la concentration magnésique élevée et de la sélectivité du canal TRPM7. Il a été démontré que le calcium régule négativement l'apoptose et est impliqué dans la survie cellulaire. Le canal TRPM7 est également connu pour exercer un rôle protecteur sur l'apoptose des cellules cancéreuses gastrique et de la vessie [**Cao et al. 2016 ; Kim et al. 2008**].

Ainsi, les conditions expérimentales mises en place favorise théoriquement une diminution de l'influx calcique médié par le canal TRPM7, celui-ci étant réduit par l'invalidation de TRPM7 ainsi que par la compétition des ions magnésium hautement concentrés. Nos résultats montrent que l'effet du siTRPM7 sur l'apoptose est potentialisé par le magnésium extracellulaire. Ces résultats suggèrent que le rôle du canal TRPM7 dans la survie cellulaire est indépendante du magnésium, et est probablement lié à une entrée de calcium.

De plus, le modèle de compensation de la transfection du siTRPM7 par supplémentation du milieu de culture en magnésium n'a pas été validé en imagerie cationique. Afin de confirmer qu'il existe bien un mécanisme d'élévation de la concentration de magnésium intracellulaire lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu contenant 10 mM MgCl₂ nous devrions réaliser des mesures de la fluorescence du MagFura-2 et du Fura-2. La quantification de l'intensité de fluorescence dans les conditions impliquant une supplémentation en MgCl₂ nous permettrait de vérifier que le niveau de fluorescence magnésique cytosolique revient au niveau contrôle en dépit de l'invalidation de TRPM7 par le siTRPM7. La quantification de l'intensité de fluorescence calcique intracellulaire (Fura-2) en présence de 10 mM MgCl₂ nous permettrait de valider une éventuelle diminution de la concentration calcique induite par l'antagonisme Mg²⁺/Ca²⁺.

L'inhibiteur de la fonction canal de TRPM7, le NS8593 n'a pas été utilisé dans le cadre de manipulation impliquant une élévation de la concentration magnésique extracellulaire. En effet, l'inhibition du canal par le NS8593 est modulée par le magnésium intracellulaire [**Shen et al. 2014**]. Il a été démontré que l'IC₅₀ du NS8593 pour une concentration magnésique cytosolique proche de zéro est de 1.6 μM contre 5.9 μM lorsque elle atteint 300 μM [Mg²⁺]_i [**Shen et al. 2014**].

Les conditions expérimentales de supplémentation magnésique induisent une variation de concentration magnésique intracellulaire, permettant la compensation de l'invalidation de TRPM7 sur la prolifération cellulaire. Dans le cas d'une inhibition du canal par le NS8593, en condition de supplémentation avec $[10 \text{ mM Mg}^{2+}]_e$, il est possible que les résultats soient biaisés par la sensibilité de l'inhibiteur pour le magnésium. En effet, pour une concentration similaire de NS8593 entre les conditions contrôle $[1 \text{ mM Mg}^{2+}]_e$ et de supplémentation $[10 \text{ mM Mg}^{2+}]_e$ l' IC_{50} de celui-ci sera différente, et il ne sera pas possible de comparer les deux conditions entre elles puisque 2 paramètres varient en mêmes temps (IC_{50} du NS8593 et $[Mg^{2+}]_e$).

Par ailleurs, il a été démontré que le canal TRPM7 interagit étroitement avec d'autres acteurs du transport magnésique tel que le canal TRPM6 [Ferioli *et al.* 2017], le canal MagT1 [Deason-Towne *et al.* 2011 ; Cazzaniga *et al.* 2017], SLC41A1 [Mandt *et al.* 2011], et SLC41A2 [Sahni *et al.* 2007]. Des mécanismes de compensation sont d'ailleurs mis en place, et il a été démontré qu'une diminution de l'expression de TRPM7 induit une élévation du niveau d'expression de MagT1 [Cazzaniga *et al.* 2017 ; Deason-Towne *et al.* 2011]. Outre la compensation par le niveau d'expression, il a été démontré qu'en cas d'invalidation du canal TRPM7, on observe une compensation de l'entrée magnésique par les canaux SLC41A1, SLC41A2 et MagT1 [Sahni *et al.* 2007 ; Mandt *et al.* 2011 ; Deason-Towne *et al.* 2011 ; Cazzaniga *et al.* 2017].

Néanmoins, la diminution de la fluorescence magnésique intracellulaire observée lorsque TRPM7 est invalidé ou inhibé (Figure 43-C et F) suggère qu'un tel phénomène n'est pas mis en place dans ce contexte et que TRPM7 est le principal régulateur de l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1.

Nos résultats ne permettent pas de prouver que le magnésium extracellulaire responsable de l'effet prolifératif pénètre la cellule par le canal TRPM7. L'ensemble des transfection ont été effectuées avec $2\mu\text{g}$ de siRNA, comme nous l'avons vu cela correspond à une diminution de l'expression de la protéine TRPM7 d'environ 70% (Figure 38-B). Par conséquent, le groupe de canaux TRPM7 restant après la transfection, soit environ 30% du contrôle, serait suffisant pour permettre l'influx magnésique pour des concentrations extracellulaires fortes (10 mM).

Aussi, il semble important de réaliser une transfection nous permettant d'atteindre l'invalidation totale du canal TRPM7. La réalisation d'une supplémentation magnésique extracellulaire ($[10 \text{ mM Mg}^{2+}]_e$) en condition siCTRL et avec une concentration de siTRPM7 permettant d'atteindre 99% d'invalidation de la protéine nous permettrait de confirmer l'implication du canal TRPM7 dans l'influx magnésique. Dans ce cas, aucune compensation de l'invalidation de TRPM7 induite par le magnésium extracellulaire ne devrait être perceptible sur la prolifération cellulaire, et la supplémentation échouerait à rétablir un profil de cycle cellulaire équivalent au siCTRL.

Dans le cas contraire, nous devrions observer un phénomène de compensation par le magnésium similaire aux conditions testés n'impliquant que $2\mu\text{g}$ de siRNA, et cela traduirait un phénomène de compensation indépendant de TRPM7, impliquant d'autres canaux magnésiques tel que MagT1.

Afin de confirmer le rôle du magnésium sur l'activation de la voie PI3K/AKT, nous avons cultivé les cellules PS-1 traitées avec la wortmannine dans un milieu supplémenté en magnésium (Figure 45). Si le canal TRPM7 régule l'activation de la voie PI3K/AKT en influençant l'entrée magnésique, l'augmentation de la concentration magnésique extracellulaire devrait compenser l'inhibition de cette voie par la wortmannine.

Le magnésium permet d'augmenter la viabilité cellulaire des cellules traitées avec la wortmannine (Figure 45-A). L'effet sur la viabilité est lié à une augmentation de la prolifération des cellules PS-1 induite par le magnésium en présence ou en l'absence d'un traitement avec la wortmannine (Figure 45-B). Le magnésium compense l'effet de la wortmannine sur l'accumulation des cellules en phase G0/G1 et augmente le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire (Figure 45-B). Enfin, le magnésium permet de compenser partiellement l'inhibition de AKT induite par la wortmannine ainsi que l'expression de PCNA, CDK2 et l'activité de GSK3 (Figure 45-C et D).

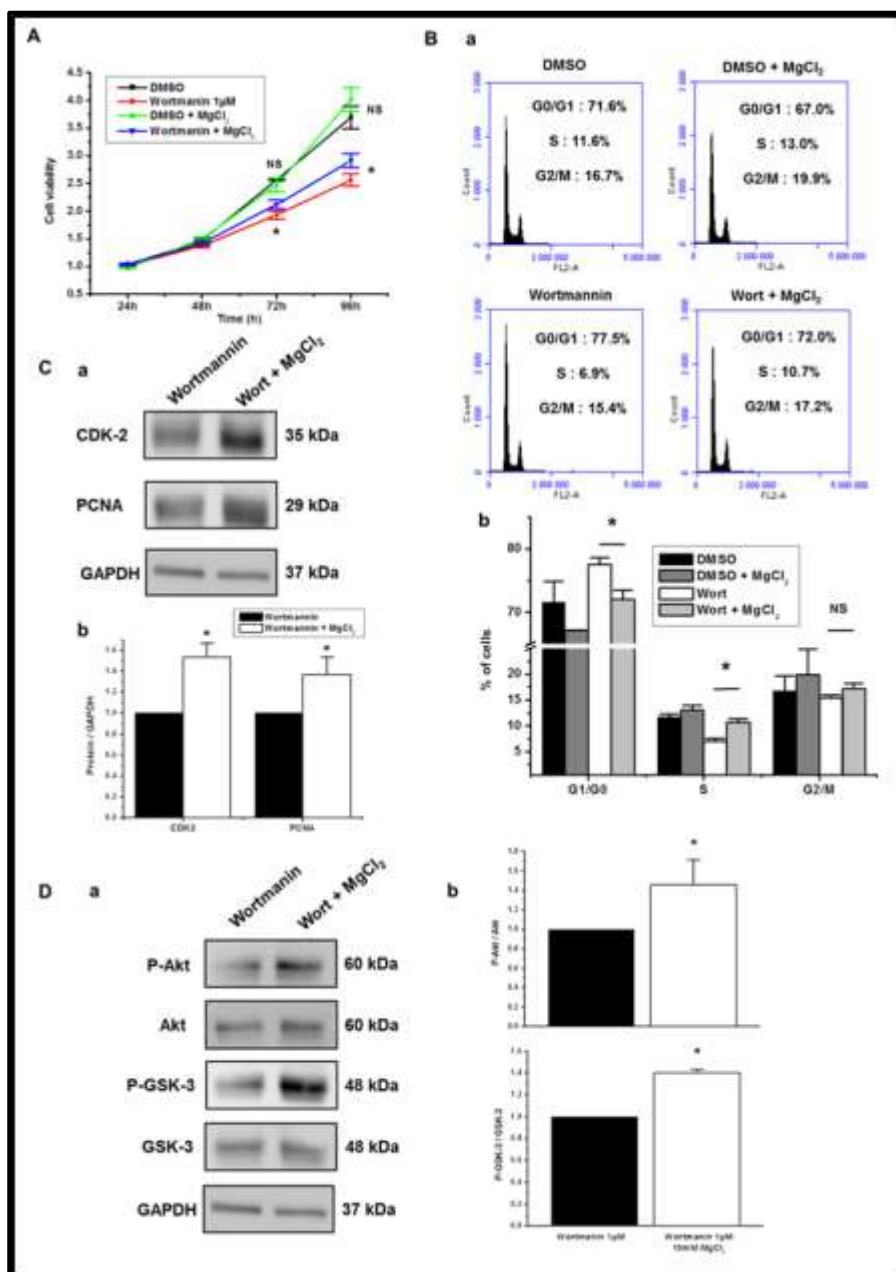


Figure 45) Effet du magnésium sur la prolifération cellulaire induite par l'activation de la voie PI3K/AKT dans les cellules PS-1 :

Cinétique de viabilité des cellules PS-1 en fonction du traitement à la wortmannine et de la concentration magnésique extracellulaire (A). Profils de cycle cellulaire des cellules PS-1 en fonction du traitement employé et de la concentration en magnésium extracellulaire (B-a) et quantification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire dans les mêmes conditions à t=72h (B-b). Western blot présentant l'expression relative des protéines CDK2 et PCNA par les cellules PS-1 traitées à la wortmannine en fonction de la concentration magnésique extracellulaire (C-a) et quantification de l'expression protéiques par rapport à la GAPDH dans les mêmes conditions à t=72h (C-b). Western blot présentant l'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées de AKT et GSK3-β par les cellules PS-1 traitées avec la wortmannine en fonction de la concentration magnésique extracellulaire (D-a) et quantification du ratio de phosphorylation de ces protéines dans les mêmes conditions à t=72h (D-b). N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

Nos résultats montrent que le magnésium est responsable de la prolifération cellulaire dépendante de l'activation de la voie PI3K/AKT dans les cellules PS-1. La supplémentation magnésique compense partiellement l'effet inhibiteur du siTRPM7 ou de la wortmannin sur la signalisation mitotique impliquant la voie PI3K/AKT et régule positivement les acteurs de la transition G1-S : CDK2 et PCNA, et l'activité de MDM2 et de la kinase GSK-3 (Figure 45).

Nos résultats montrent pour la première fois le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération cellulaire ainsi que son implication dans le maintien de l'homéostasie magnésique dans les CSP humaine activées.

Nous avons démontré, au cours de ce travail, que le canal TRPM7 régule la prolifération des CSP activées en permettant l'activation de la voie PI3K/AKT *via* le contrôle de la concentration magnésique cytosolique. L'activation de la voie PI3K/AKT permet l'inhibition de la kinase GSK3- β et l'activation du régulateur de P53 : MDM2, influençant directement la transition G1-S *via* le contrôle de l'expression de CDK2 et PCNA.

II) Rôle du canal TRPM7 dans l'activation des cellules PS-1 :

1) Rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition d'un phénotype prolifératif :

Les capacités prolifératives importantes sont caractéristiques de l'activation des CSP [Apte *et al.* 2002]. Après avoir démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans la prolifération des CSP, nous avons cherché à démontrer son influence sur l'activation des CSP.

Il a été démontré que le traitement à l'acide rétinoïque et ses métabolites permet de réamorcer le stockage lipidique sous forme vésiculaire caractéristique de l'état quiescent dans les CSP [McCaroll *et al.* 2006 ; Fieke *et al.* 2011]. Les vésicules

lipidiques contenant l'acide rétinoïque constituant, par ailleurs, l'unique marqueur de quiescence dans les CSP humaines **[Friberg et al. 2017]**.

L'expression *de novo* des vésicules lipidiques induite par le rétinol diminue le niveau d'activation des CSP qui expriment alors un phénotype proche de la quiescence **[McCaroll et al. 2006]**. Le rétinol permet également d'empêcher l'activation des CSP induite par des cytokines lorsqu'il est utilisé sur CSP quiescente **[McCaroll et al. 2006]**. Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé l'ATRA (All Trans Retinoic Acid ; 1µM pendant 1 semaine) afin de permettre l'expression d'un phénotype quiescent par les cellules PS-1. Il a été démontré que les CSP répondent au traitement à l'ATRA par une augmentation de l'expression de vésicules lipidiques caractéristiques de l'état de quiescence **[Fieke et al. 2011 ; McCaroll et al. 2006]**.

Afin de déterminer le rôle du canal TRPM7 dans l'activation des cellules PS-1 nous avons induit leur quiescence par traitement à l'ATRA (Figure 46).

Nos résultats d'immunofluorescence montrent une augmentation de l'expression de gouttelettes lipidiques dans les cellules PS-1 traitées à l'ATRA permettant de valider l'effet sur l'induction de la quiescence (Figure 46-A-a).

De plus, Fieke et collaborateurs ont décrit d'autres variations phénotypiques caractéristiques de l'induction de la quiescence, il a notamment été démontré que l'induction d'un phénotype quiescent par l'ATRA engendre une variation de l'expression des marqueurs de CSP, notamment une diminution de la vimentine et une augmentation de la desmine en parallèle de l'augmentation des vésicules lipidiques **[Fieke et al. 2011]**. Nos résultats démontrent également une augmentation de l'expression de desmine et une diminution de l'expression de vimentine (Figure 46-A-b et B).

Nous montrons donc une variation de l'expression de ces marqueurs en accord avec les travaux publiés, nous pouvons considérer que le modèle d'induction de la quiescence par l'ATRA est validé sur les cellules PS-1 (Figure 46).

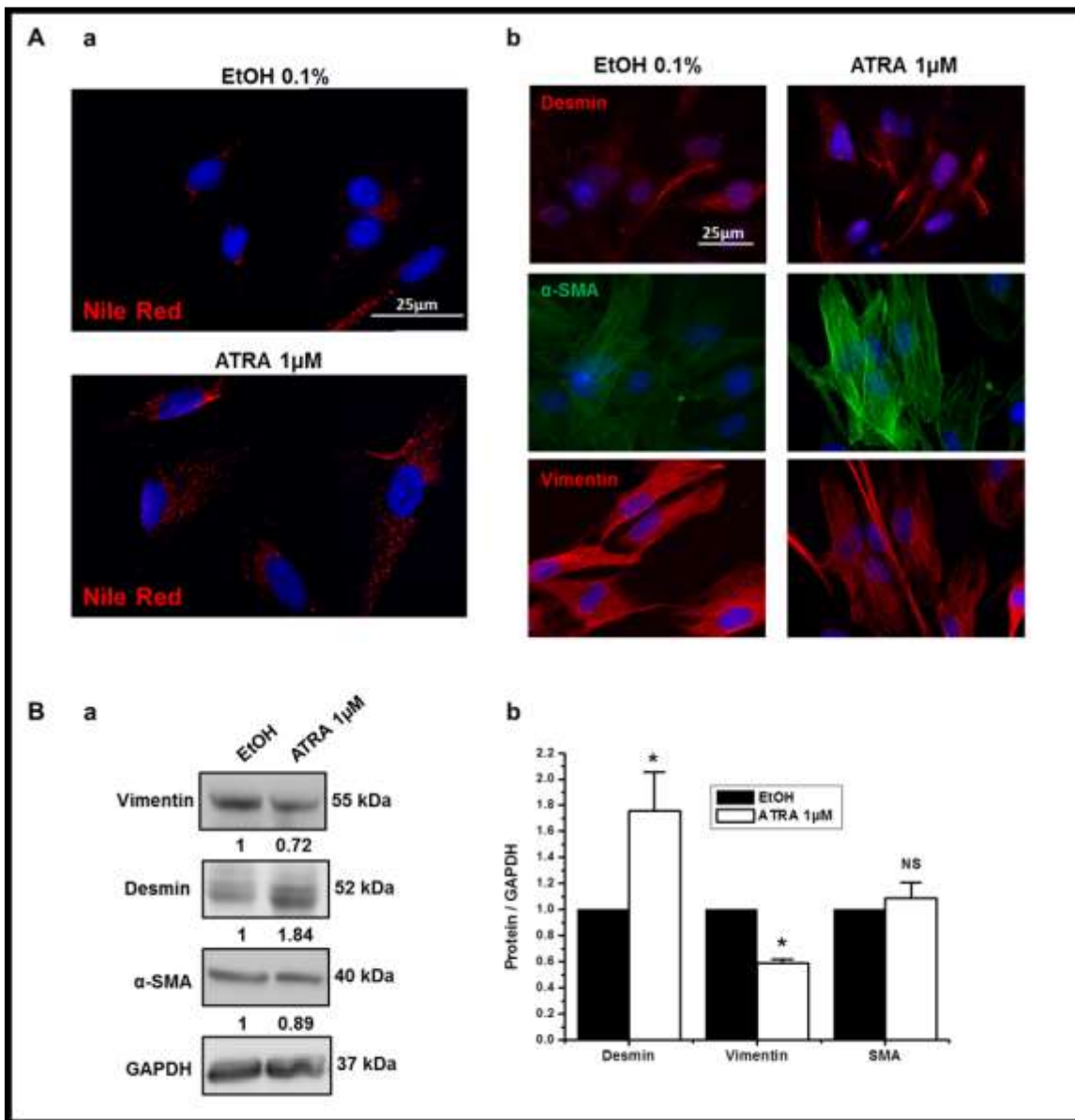


Figure 46) Effet du traitement à l'ATRA sur l'activation des cellules PS-1:

Les résultats représentent les cellules PS-1 traitées pendant 1 semaine avec 1μM d'ATRA ou avec le solvant EtOH seul. Images de microscopie à fluorescence représentant le marquage des vésicules lipidiques au Nile Red (A-a) et les marquages par immunodétection des protéines desmine, α-SMA et vimentine (A-b). Western blot présentant l'expression relative des protéines vimentine, desmine et de α-SMA (B-a) et quantification de l'expression de ces protéines par rapport à la GAPDH (B-b). N=4 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

ATRA : All Trans Retinoic Acid ; EtOH : solvant éthanol ; GAPDH : GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase.

McCaroll et collaborateurs ont décrit une inhibition de l'induction de l'expression de α -SMA induite par le rétinol et ses métabolites [McCaroll et al. 2006]. De façon surprenante, aucun effet sur l'expression de l' α -SMA n'est quantifiable suite au traitement des cellules PS-1 avec 1 μ M d'ATRA (Figure 46-A-b et B).

Néanmoins, Fieke et collaborateurs montre que l'ATRA ne génère aucune variation d'expression de α -SMA [Fieke et al. 2011]. Il est nécessaire de préciser que McCaroll conclut sur une inhibition de « l'induction » de l'expression de α -SMA et non sur une réduction de son niveau d'expression. Par conséquent, il est probable que le rétinol et ses métabolites, notamment l'ATRA, exerce un effet inhibiteur sur le déclenchement de l'expression du principal marqueur d'activation des CSP mais ne permettent pas une diminution de son expression une fois que celui-ci est exprimé.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'ATRA sur la prolifération des cellules PS-1 et le maintien de l'homéostasie magnésique (Figure 47).

Nos résultats montrent que l'ATRA exerce un effet inhibiteur sur l'expression du canal TRPM7 (Figure 47-A et B)) ainsi que sur la prolifération des cellules PS-1 (Figure 47-C). L'ATRA induit un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Figure 47-D) avec diminution de l'expression de CDK2, PCNA et de l'activation de la voie AKT (Figure 47-E). D'autre part le traitement à l'ATRA induit une diminution de la fluorescence magnésique accompagnée d'une légère augmentation de la fluorescence calcique dans les cellules PS-1 (Figure 47-F).

Nos précédents résultats impliquant l'invalidation ou l'inhibition du canal TRPM7 montrent un blocage similaire (Figure 38 et 43). L'état activé étant caractérisé par une augmentation de la prolifération des CSP, il est normal que l'induction de la quiescence diminue la prolifération cellulaire. Il a été montré, *in vitro*, sur cellules mésenchymateuse et cancéreuses, que l'ATRA induit une diminution de la prolifération cellulaire *via* un blocage en phase G0/G1 du cycle cellulaire. [Mangiarotti et al. 1998 ; Yu et al. 2005 ; Jiang et al. 2013].

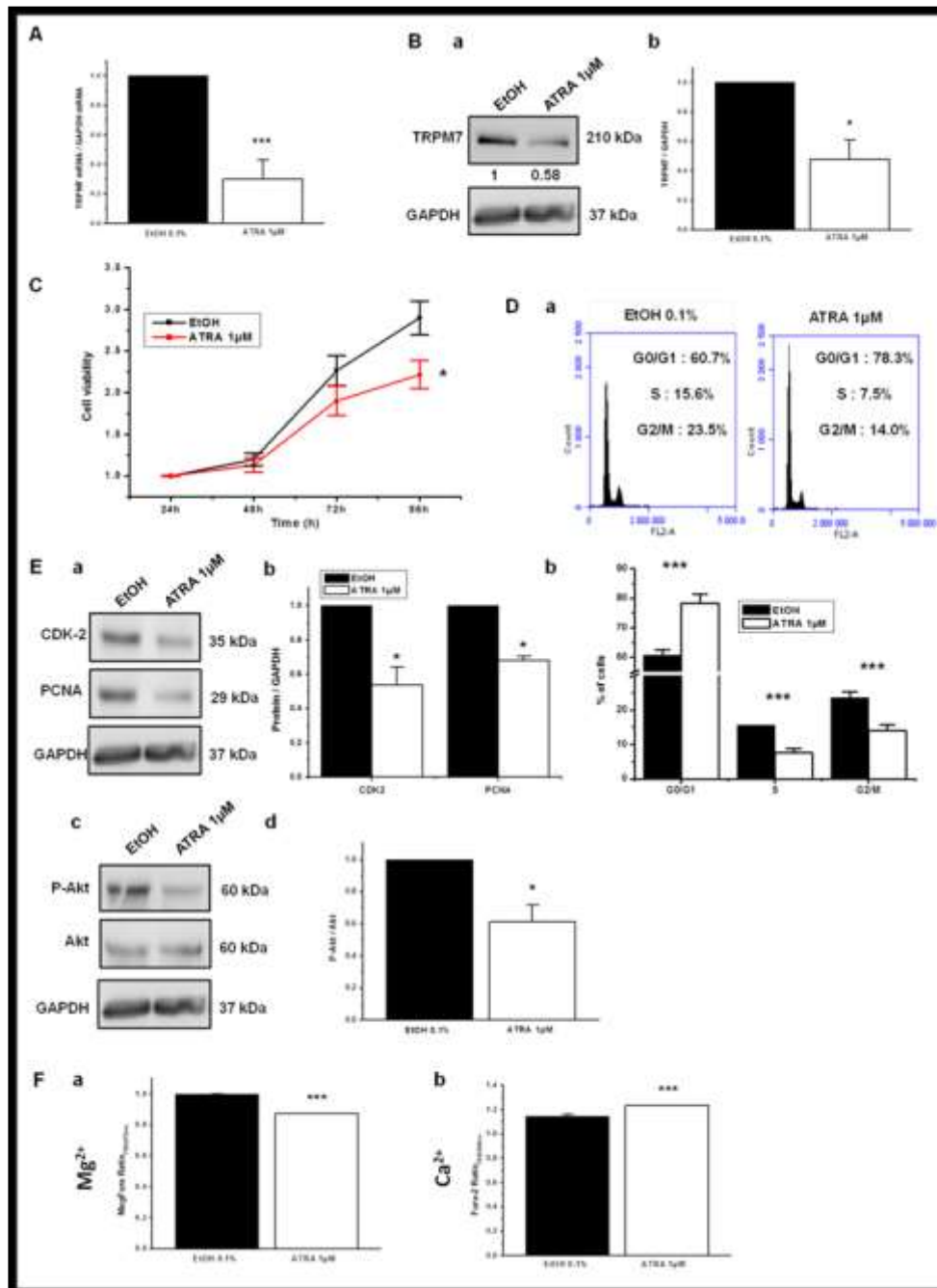


Figure 47) Effet du traitement à l'ATRA sur la prolifération des cellules PS-1 :

Les résultats représentent les cellules PS-1 traitées pendant 1 semaine avec 1µM d'ATRA ou avec le solvant EtOH seul. Quantification de l'expression des ARNm par QPCR (A) ou des protéines par Western blot (B) de TRPM7 en utilisant la GAPDH comme gène de référence. Graphique de la cinétique de viabilité cellulaire par test au MTT (C). Profils de cycle cellulaire en fonction du traitement (D-a) et quantification du pourcentage de cellules réparties dans chaque phase du cycle cellulaire à t=96h par rapport au test au MTT (D-b). Western blot représentant le niveau d'expression des protéines CDK2 et PCNA (E-a) et quantification de l'expression de ces protéines par rapport à la GAPDH à t=96h (E-b). Western blot représentant l'expression des formes phosphorylé et non phosphorylé de AKT (E-c) et quantification du ratio de phosphorylation de AKT (E-d). Quantification du ratio de fluorescence du MagFura-2 dans les cellules PS-1 (F-a). Quantification du ratio de fluorescence du Fura-2 dans les cellules PS-1 (F-b). N=3 ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Par ailleurs, Jiang et collaborateurs ont démontré qu'un traitement avec 1 μ M d'ATRA induisait une augmentation de l'expression des mRNA de TRPC 3,4 et 6 corrélée à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les cellules cancéreuses pulmonaires [Jiang et al. 2013].

Les résultats que nous obtenons en traitant les cellules PS-1 avec l'ATRA confirment l'effet anti prolifératif et inducteur de quiescence induit par l'ATRA et décrit dans la littérature. De plus, nous montrons que l'ATRA module également l'expression d'un canal TRP et influence les concentrations calcique et magnésique intracellulaire (Figure 47).

Nous avons précédemment démontré que le canal TRPM7 favorise la prolifération des cellules PS-1 en activant la voie PI3K/AKT *via* le magnésium (Figure 44). Nous montrons que l'ATRA induit une diminution de l'expression du canal TRPM7 associée à une baisse de la concentration magnésique intracellulaire et de la prolifération dépendante de l'activation d'AKT (Figure 47).

Ces résultats suggèrent que le niveau d'activation des cellules PS-1 est lié au canal TRPM7 dont l'expression diminue avec l'induction de la quiescence.

Le modèle expérimental d'induction de la quiescence des CSP par l'ATRA permet de diminuer le niveau d'activation des cellules traitées. L'utilisation d'un modèle expérimental permettant d'augmenter le niveau d'activation est nécessaire afin de confirmer le lien entre le canal TRPM7 et le niveau d'activation des CSP.

Afin de confirmer le rôle du canal TRPM7 dans l'activation des CSP, nous avons cultivé les cellules PS-1 dans le milieu conditionné des cellules d'ACP MIA Paca-2.

En effet, le contact entre les cellules d'ACP et les CSP favorise l'activation des CSP. Il a été démontré *in vitro* que les milieux conditionnés de cellules cancéreuses permettent d'augmenter le niveau d'activation des CSP ainsi que leurs capacités prolifératives, invasive et sécrétoires [Apte et al. 1999 ; Apte et al. 2012].

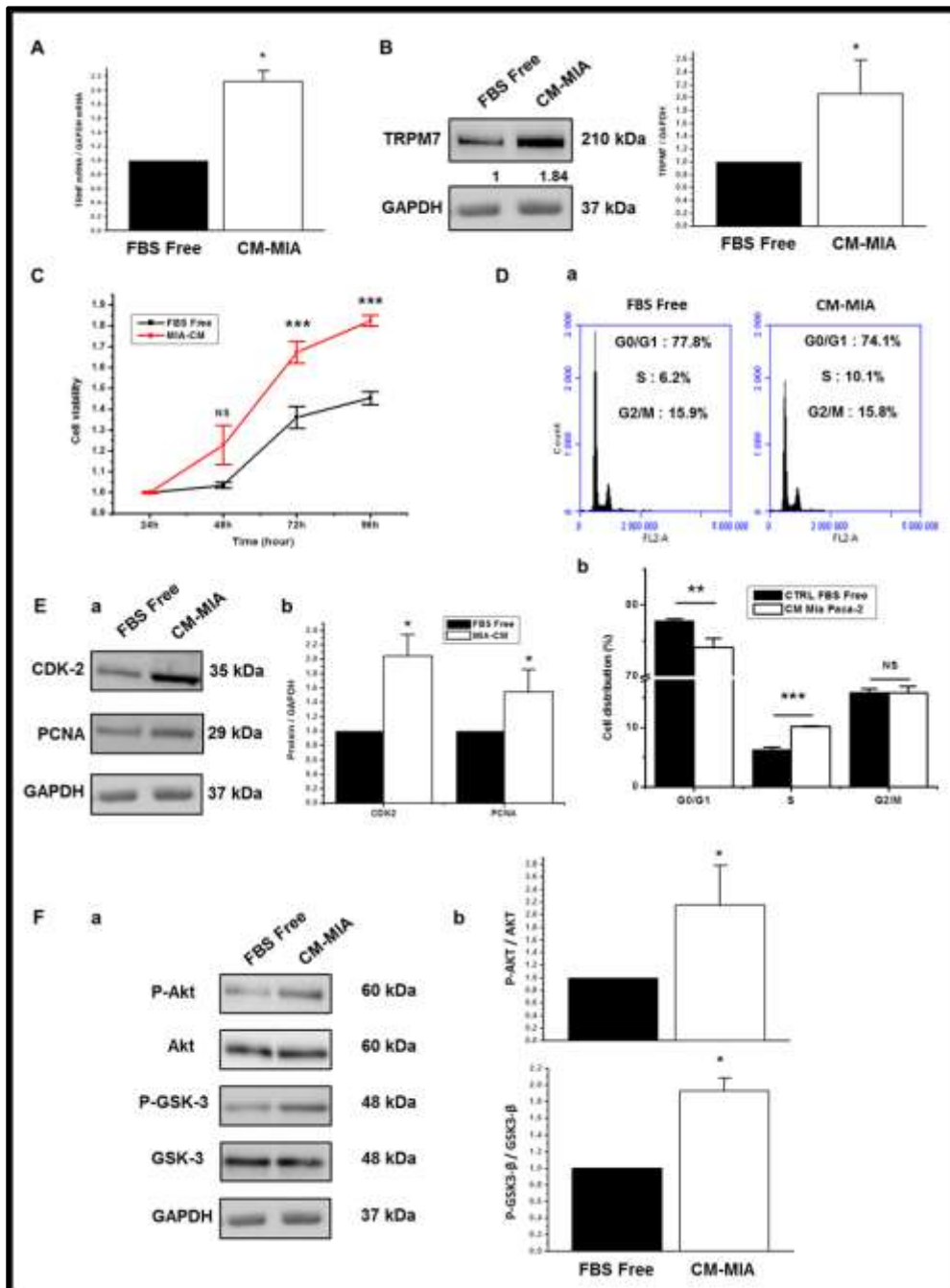


Figure 48) Effet du traitement au milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 sur la prolifération des cellules PS-1 :

Les résultats présentent les cellules PS-1 traitées ou non avec le milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 pendant 96h. Quantification de l'expression des ARNm par QPCR (A) ou des protéines par Western blot (B) de TRPM7 en utilisant la GAPDH comme gène de référence. Graphique de la cinétique de viabilité cellulaire par test au MTT (C). Profils de cycle cellulaire en fonction du traitement (D-a) et quantification du pourcentage de cellules réparties dans chaque phase du cycle cellulaire à t=96h (D-b). Western blot représentant le niveau d'expression des protéines CDK2 et PCNA (E-a) et quantification de l'expression de ces protéines par rapport à la GAPDH à t=96h (E-b). Western blot représentant l'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées de AKT et GSK3-β (F-a) et quantification du ratio de phosphorylation de AKT et de GSK3-β à t=96h (F-b). N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

CM-MIA : milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 ; FBS Free : milieu 0% SVF.

Les cellules PS-1 ont donc été traitées avec le milieu conditionné (MC) de cellules MIA Paca-2 afin d'augmenter leur niveau d'activation. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de TRPM7 induite par le milieu conditionné de cellules MIA Paca-2 (Figure 48-A et B).

L'augmentation de l'expression du canal TRPM7 induite par le milieu conditionné est reliée aux capacités prolifératives des cellules PS-1 (Figure 48-C) avec une diminution de l'accumulation des cellules en phase G0/G1 (Figure 48-D).

Nos précédents résultats ont permis de démontrer le rôle primordial joué par le canal TRPM7 dans la prolifération des cellules PS-1. L'activation des CSP est connue pour être accompagnée d'une augmentation de la prolifération cellulaire, et nos résultats confirment cet effet. Dans la mesure où nous avons démontré que le chanzyme TRPM7 est indispensable à la prolifération des cellules PS-1 et que son expression varie en fonction du niveau d'activation il est possible que celui-ci régule directement le processus d'activation des CSP.

Le milieu conditionné de MIA Paca-2 induit une augmentation du niveau de phosphorylation de AKT et GSK3- β lié à une augmentation de l'expression de PCNA et CDK2. Ces résultats confirment le lien entre le canal TRPM7, et les acteurs prolifératifs précédemment cité. Les cellules PS-1 traitées avec le MC de cellules d'ACP constituent également un modèle de surexpression du canal TRPM7 par rapport au contrôle non traité, et confirme que le niveau d'expression de CDK2 et PCNA est directement relié à celui de TRPM7.

Nos résultats montrent que le niveau d'expression du canal TRPM7 est corrélé avec l'état des cellules PS-1. Lorsqu'elles sont dans un état quiescent induit par l'ATRA le canal est faiblement exprimé (Figure 47-A et B), TRPM7 est moyennement exprimé en l'absence de traitement et son niveau d'expression augmente lorsque les PS-1 sont en contact avec le MC de MIA Paca-2 (Figure-48 A et B).

Nous avons cherché à confirmer les résultats précédemment obtenue sur le rôle du canal TRPM7 dans l'activation des CSP en incluant à nos travaux une autre lignée de CSP : la lignée RLT-PSC. Les cellules RLT-PSC sont décrites comme étant activées *in vivo* par des épisodes inflammatoires chroniques avant qu'elles ne soient isolées [**Jesnowski et al. 2005**].

Elles sont donc théoriquement dans un état d'activation supérieur aux cellules PS-1, initialement quiescentes et activées en culture [Fieke *et al.* 2009].

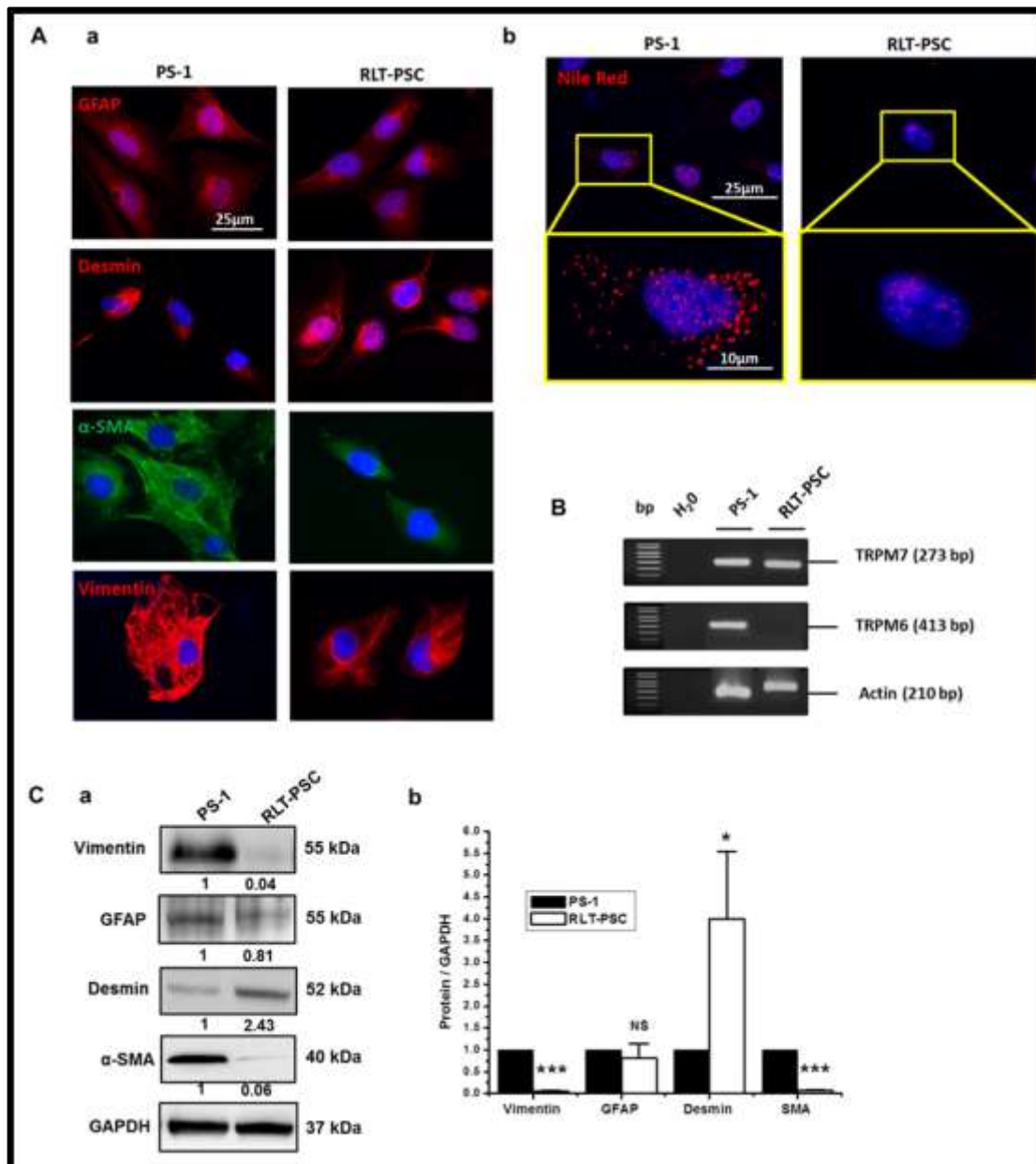


Figure 49) Caractérisation des cellules RLT-PSC :

Images de microscopie à immunofluorescence présentant les protéines GFAP, desmine, α-SMA et vimentine dans les cellules PS-1 et RLT-PSC (A-a), ainsi que le marquage des vésicules lipidiques dans les deux lignées de CSP (A-b). Illustration de PCR présentant l'expression des canaux TRPM7 et TRPM6 dans les cellules PS-1 et RLT-PSC, en utilisant l'actine comme gène de référence (B). Images de Western blot présentant l'expression relative des marqueurs de CSP sur les deux lignées de CSP (C-a) et quantification de l'expression des marqueurs protéiques dans les cellules PS-1 et RLT-PSC (C-b). N=4 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Par conséquent, si l'expression du canal TRPM7 augmente avec l'activation alors nous devrions constater que les cellules RLT-PSC l'expriment d'avantage que les PS-1.

Nous avons donc réalisé une caractérisation comparative des marqueurs d'activation et de prolifération initialement identifiés sur les PS-1, ainsi que des capacités prolifératives des deux lignées (PS-1 et RLT-PSC) (Figure 49).

Les cellules RLT-PSC ont dans un premier temps été caractérisées et l'expression des marqueurs de CSP, des vésicules lipidiques ainsi que de l' α -SMA ont été comparées au PS-1 (Figure 49-A-a). Les RLT-PSC expriment faiblement l' α -SMA et la vimentine, présentent moins de vésicules lipidiques et sur-expriment la desmine comparé aux cellules PS-1 (Figure 49-A et C). Le fait que les cellules RLT-PSC présentent moins de vésicules lipidiques cytosolique confirment qu'elles sont dans un état d'activation supérieur au PS-1. L'importante variation d'expression des marqueurs de CSP et de l' α -SMA existant entre les deux lignées suggèrent qu'elles possèdent toute deux des phénotypes différents.

Effectivement, il a été démontré qu'il existe une certaine variabilité de phénotypes au sein d'une population de CSP. Ces différents phénotypes ou sous-types de CSP sont également caractérisé en fonction de l'agressivité ou niveau d'activation des CSP **[Neuzillet et al. 2019]**.

Nous avons également étudié l'expression des canaux TRPM7 et TRPM6 dans les 2 lignées et contrairement aux cellules PS-1, les cellules RLT-PSC n'expriment pas le canal TRPM6 (Figure 49-B).

Le niveau d'expression du canal TRPM7 a également été quantifié dans les deux lignées (Figure 50-A). Nos résultats montrent que les cellules RLT-PSC sur-expriment le canal TRPM7 par rapport au PS-1. La surexpression du canal TRPM7 dans les cellules RLT-PSC est associée à des capacités prolifératives importante (Figure 50-B et C). Ces résultats confirment que le niveau d'activation des CSP est lié au niveau d'expression du canal TRPM7.

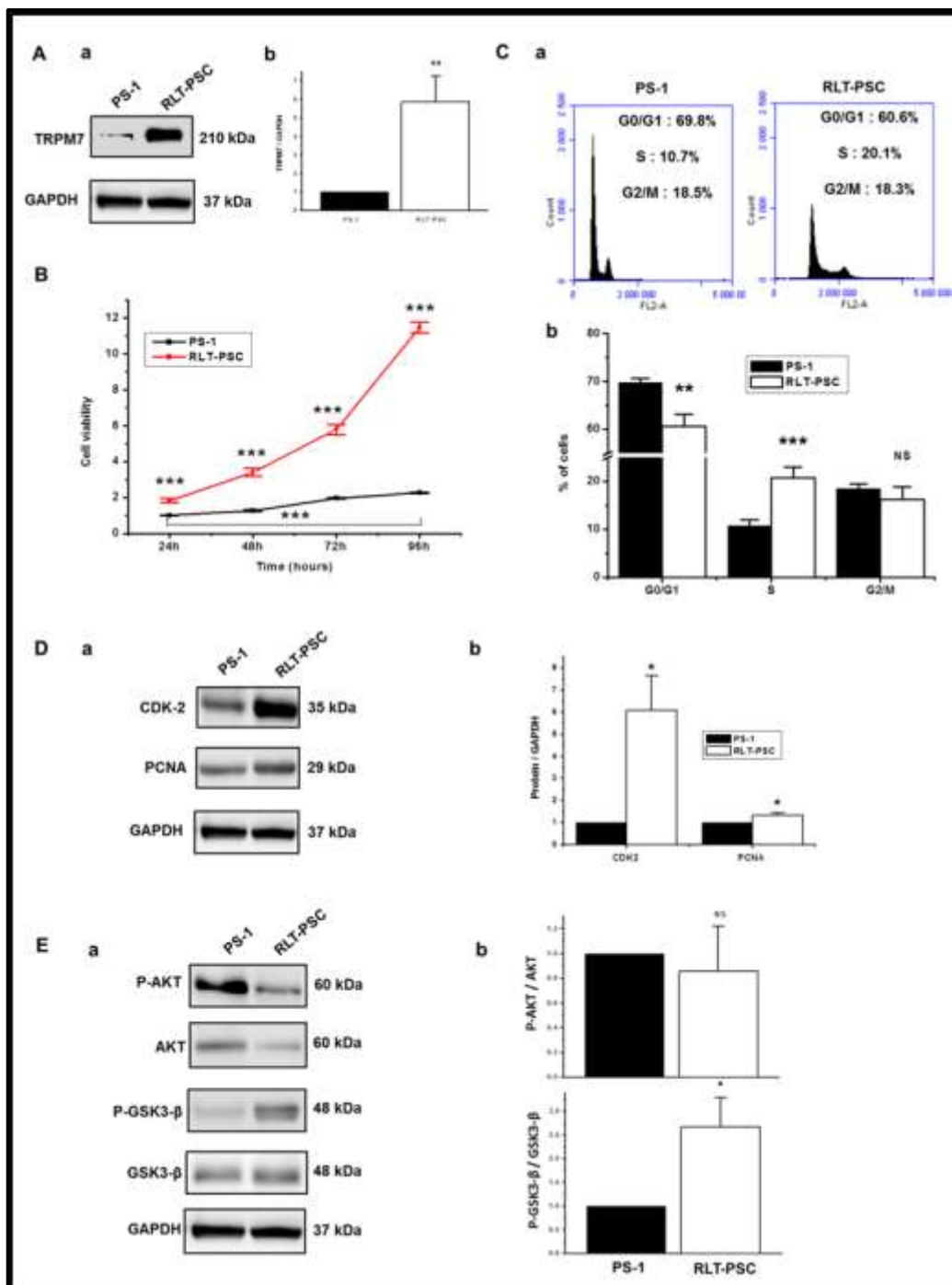


Figure 50) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des CSP :

Western blot présentant l'expression du canal TRPM7 dans les cellules PS-1 et RLT-PSC (A-a) et quantification de l'expression du canal TRPM7 dans les deux lignées par rapport à la GAPDH (A-b). Cinétiques de viabilité des deux lignées, par métabolisation du MTT (B). Profils de cycle cellulaire dans les deux lignées de CSP, en cytométrie de flux (C-a) et quantification du pourcentage de cellules dans les phases du cycle à t=72h (C-b). Expression relative des protéines CDK-2 et PCNA par western blot dans les cellules PS-1 et RLT-PSC (D-a) et quantification de l'expression de ces protéines à t=72h (D-b). Western blot représentant l'expression relative des formes phosphorylées et non phosphorylées de AKT et GSK3-β dans les deux lignées de CSP (E-a) et quantification de leur ratio de phosphorylation respectifs à t=72h (E-b). N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En effet, les cellules RLT- PSC présentent un temps de doublement de la population cellulaire d'environ 24h contre 48h pour les cellules PS-1 (Figure 50-B). L'analyse du cycle cellulaire montre que les cellules RLT-PSC sont très prolifératives avec moins de cellules dans la phase G0/G1 et un pourcentage de cellules en phase S correspondant au double de celui des cellules PS-1. Il est à noter que le pourcentage de cellule en phase G2/M du cycle cellulaire ne varie pas entre les lignées(Figure 50-C).

Nos précédents résultats ont permis d'établir un lien entre le niveau d'expression du canal TRPM7 et la transition en phase S, sans que le niveau d'expression du canal ne modifie le pourcentage de cellules en phase G2/M (Figure 38-D). Les résultats obtenus sur la lignée RLT-PSC confirment que le niveau d'expression du canal TRPM7 favorise exclusivement la transition G1-S sans influencer la transition en phase G2/M.

De façon intéressante les cellules RLT-PSC ne présentent pas un niveau d'activation de la voie PI3K/AKT plus important que dans les PS-1 (Figure 50-E). Néanmoins elles présentent un niveau de phosphorylation de la kinase GSK3 supérieur au PS-1 suggérant que le canal TRPM7 puisse réguler d'autres voies de signalisation telles que mTOR dans les cellules RLT-PSC. Les capacités prolifératives des cellules RLT-PSC sont également reliées à une forte expression de CDK2 et PCNA (Figure 50-D). Néanmoins l'expression de P53 ainsi que l'activation de MDM2 n'ont pas été investigués sur le modèle cellulaire des RLT-PSC.

Nos résultats présentent la comparaison en fonction du niveau d'activation des lignées cellulaire tout en considérant la lignée RLT-PSC comme un modèle de surexpression du canal TRPM7. Afin de confirmer le rôle du canal TRPM7 dans l'activation et la prolifération des CSP il serait intéressant d'invalider et/ou inhiber le canal TRPM7 sur les cellules RLT-PSC. Induire une diminution de l'expression du canal TRPM7 sur ce modèle devrait conférer au RLT-PSC des capacités prolifératives proches de celles des cellules PS-1 et confirmerait le lien entre activation, prolifération et expression du canzyne TRPM7.

Nous avons démontré pour la première fois que le niveau d'expression du canal TRPM7 varie avec le niveau d'activation des CSP et influence directement la prolifération cellulaire caractéristique du processus d'activation.

Nous montrons également que le niveau d'expression d'un canal ionique est directement relié au niveau d'activation des CSP et à l'acquisition d'un phénotype prolifératif par ces dernières et que le canal TRPM7 régule la prolifération cellulaire caractéristique de l'activation dans 2 lignées de CSP ainsi que sur 2 modèles d'activation / quiescence différents.

2) Rôle du canal TRPM7 sur l'expression de α -SMA :

Après avoir démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans l'activation des CSP nous nous sommes intéressés au rôle du canal TRPM7 sur l'expression du principal marqueur d'activation des CSP : l' α -SMA.

Dans un premier temps, nous avons observé l'effet du siTRPM7 sur l'expression des marqueurs de CSP : vimentine, desmine et α -SMA (Figure 51-A). En effet, nos précédents résultats montrent une variation de l'expression de ces marqueurs et du canal TRPM7 entre les deux lignées de CSP (Figure 49-C et 48-B) ainsi que dans les cellules PS-1 traitées avec l'ATRA (Figure 46-B et 47-B). Ces précédents résultats suggèrent que le canal TRPM7 régule l'expression de ces marqueurs et qu'ils sont potentiellement impliqués dans l'activation des CSP.

Nos résultats montrent que l'inactivation du canal TRPM7 induit une diminution de l'expression de la desmine ainsi qu'une augmentation de l'expression de α -SMA et de la vimentine (Figure 51-A et B). Ces résultats suivent les variations d'expression de ces protéines précédemment quantifiées entre les cellules PS-1 et RLT-PSC, et confirme que le canal TRPM7 module leur niveau d'expression.

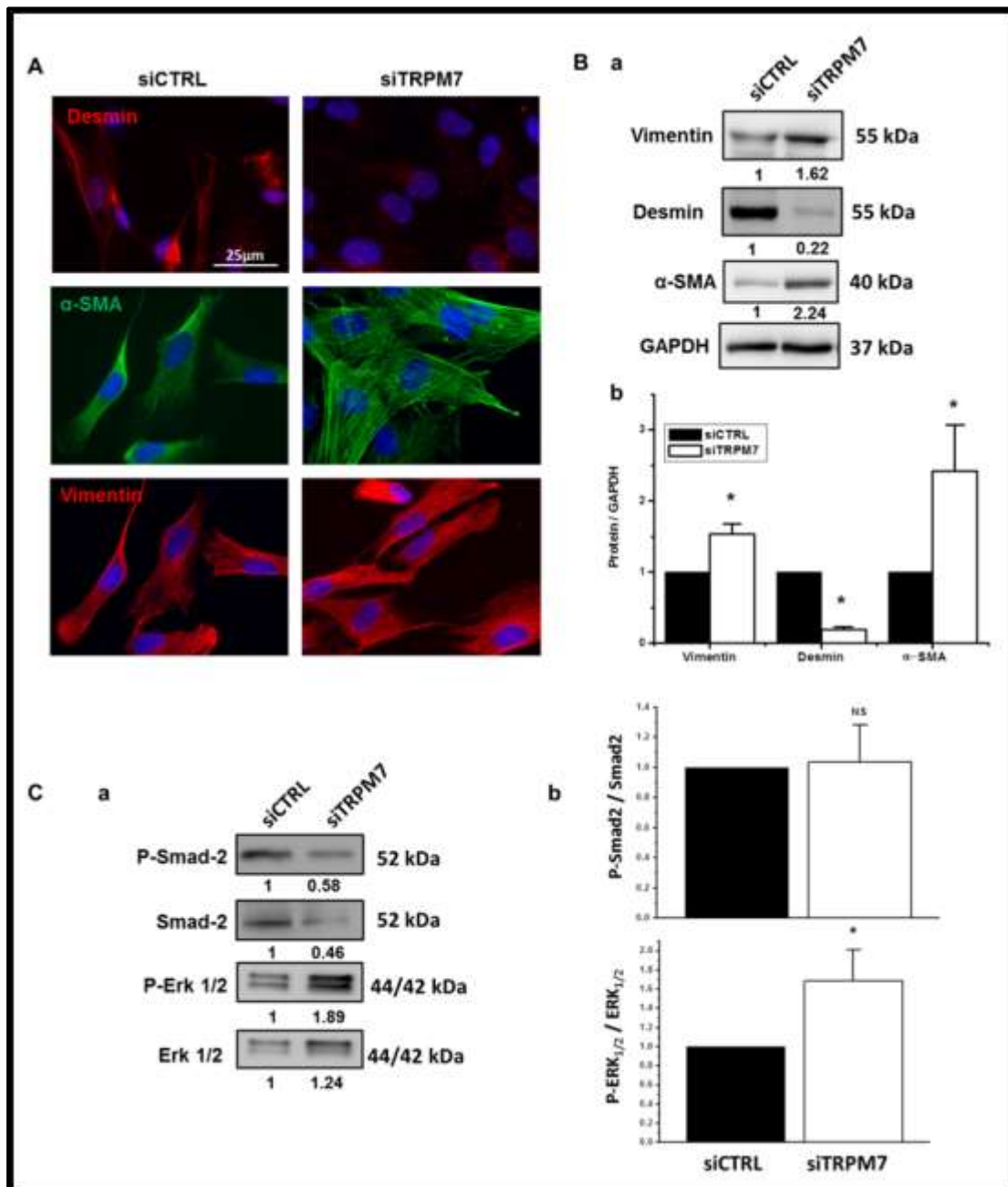


Figure 51) Rôle du canal TRPM7 sur l'expression des marqueurs de CSP par les cellules PS-1 :

Image de microscopie à immunofluorescence montrant l'expression des protéines desmine, α -SMA et vimentine en fonction des conditions de transfection avec siRNA (A). Western blot représentant l'expression relative des protéines desmine, α -SMA et vimentine dans les cellules PS-1 en fonction du siRNA (B-a) et quantification de l'expression de ces protéines (B-b). Western blot présentant l'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées des protéines Smad2 et ERK_{1/2} (C-a) et quantification du ratio de phosphorylation de ces protéines (C-b). Les expériences ont été réalisées à t=72h post transfection ; N=4 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

L' α -SMA et la vimentine sont deux protéines impliquées dans le processus de contractilité cellulaire. Il a notamment été démontré que la vimentine est une protéine du cytosquelette, de la classe des filaments intermédiaires, impliquée dans la contraction des CMLV (Cellules Musculaires Lisses Vasculaires) [Schiffers *et al.* 2000 ; Dale *et al.* 2017].

La desmine quand, à elle, est un filament intermédiaire du cytosquelette principalement impliquée dans le maintien de la morphologie des cellules, et le soutien physique des organites telles que le noyau ou les mitochondries. Un rôle putatif est également attribué à la desmine dans l'expression de gènes *via* interaction avec les lamines nucléaires et *in fine* l'ADN [Hutchison 2002 ; Tolstonog *et al.* 2002].

Les résultats obtenus sur les cellules RLT-PSC et sur les cellules PS-1 transfectées avec le siTRPM7 suggèrent que le canal TRPM7 régule positivement l'expression de la desmine et inhibe l'expression de la vimentine et de l' α -SMA. Nos résultats, au même titre que les éléments bibliographiques, suggèrent le lien entre l'expression de ces protéines et les capacités prolifératives des CSP.

Bien qu'aucune quantification de l'indice de circularité des cellules n'ait été effectuée, les images de microscopie à fluorescence révèlent une modification morphologique induite par le canal TRPM7. La diminution de l'expression du canal TRPM7 semble induire une augmentation de la surface cellulaire probablement liée à l'augmentation de l'expression de α -SMA. De la même façon les cellules RLT-PSC présentent une morphologie arrondie et occupent une surface cellulaire beaucoup moins importante que les cellules PS-1 exprimant moins TRPM7 et desmine mais présentant un fort niveau d'expression de α -SMA et de vimentine. Afin de confirmer le lien entre le canal TRPM7 et la morphologie des CSP il serait intéressant de calculer l'indice de circularité des cellules PS-1 et RLT-PSC. Ces résultats pourraient également suggérer que le canal TRPM7 est responsable du phénotype prolifératif des CSP. En effet, nous avons démontré, d'une part, que le canzyme TRPM7 est indispensable à la prolifération des cellules PS-1. Et, d'autre part, que le canal TRPM7 régule

négativement l'expression de l' α -SMA et de la vimentine qui sont 2 protéines impliquées dans la contractilité des cellules.

L' α -SMA étant le principal marqueur d'activation des CSP, nous nous sommes focalisé sur l'influence du canal TRPM7 sur son expression.

Les images de microscopie à fluorescence suggèrent que le canal TRPM7 favorise également l'incorporation et la polymérisation de l' α -SMA au sein des fibres de stress en plus de son effet sur l'expression de l' α -SMA (Figure 51-A). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en investiguant les voies de signalisation impliquant les Rho kinases (RhoA notamment) et la MLCK (Myosine Light Chain Kinase).

Il est à noter que nous avons démontré, en accord avec les travaux de Fieke et collaborateurs, que le traitement avec l'ATRA ne module pas le niveau d'expression de α -SMA [Fieke *et al.* 2011]. Néanmoins, les images obtenues en microscopie à fluorescence montrent que les cellules traitées à l'ATRA expriment l' α -SMA sous forme de fibres de stress alors que les cellules contrôles traitées à l'EtOH possèdent un marquage pour l' α -SMA ne faisant pas apparaître de formations fibrillaires de ce type (Figure 46-A-b). Ces résultats suggèrent que même en l'absence de modification de l'expression de α -SMA il est possible que TRPM7 régule la polymérisation des fibres de stress.

Nous avons également étudié l'effet de l'inactivation transitoire du canal TRPM7 sur l'expression de α -SMA. Le siTRPM7 augmente à la fois l'expression de α -SMA et d'ERK1/2. La principale voie de synthèse de l' α -SMA dépend de l'activation du récepteur au TGF [Neuzillet *et al.* 2014]. Il existe plusieurs voies de signalisation intracellulaire concernant le TGF, une voie principale impliquant Smad-2/3 et une voie secondaire impliquant la voie des MAPK. Aucune variation significative de l'activation de la voie Smad n'est induite par le siTRPM7, alors que celui-ci génère une augmentation de l'activation de la voie ERK1/2 (Figure 51-C). Nos résultats suggèrent que TRPM7 régule négativement la synthèse de α -SMA en inhibant l'activation de la voie ERK1/2. De plus, McCaroll et collaborateurs ont démontré que l'inhibition de α -SMA par l'acide rétinoïque et ses métabolites induisait également une diminution de l'activation de la voie MAPK sur les CSP [McCaroll *et al.* 2006].

Nous avons observé l'effet du NS8593 ainsi que de la wortmannine sur l'expression de α -SMA et l'activation de ERK1/2 (Figure 52).

Nous avons précédemment démontré que, contrairement au siTRPM7, le NS8593 n'induit pas une augmentation de l'activation de ERK1/2 (Figure 41). De la même façon nos résultats présents montrent que le NS8593 ne modifie pas l'expression de α -SMA (Figure 52-A et B) confirmant ainsi que la synthèse de α -SMA passe bien par la voie ERK dans les cellules PS-1 et que le canal TRPM7 inhibe l'activité de cette voie.

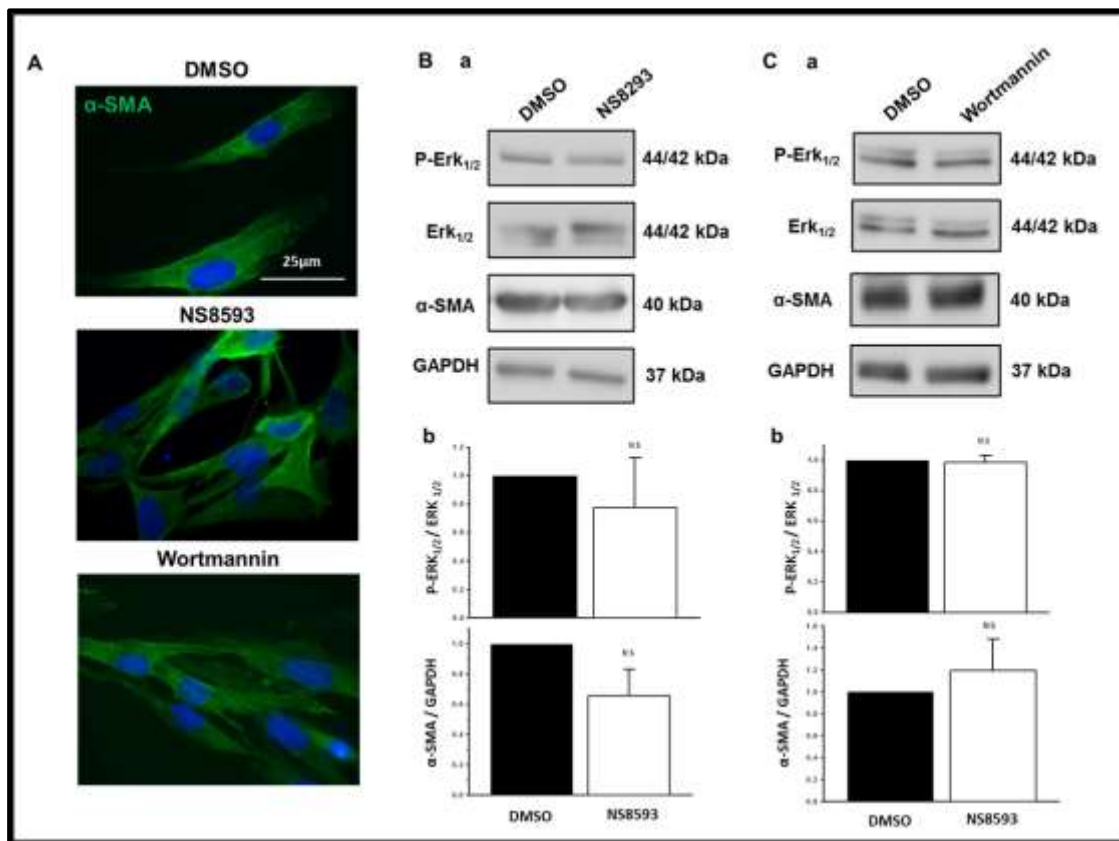


Figure 52) Rôle du canal TRPM7 et de la voie AKT sur l'expression de α -SMA par les cellules PS-1 :

Images de microscopie à immunofluorescence montrant l'expression de α -SMA dans les cellules PS-1 traitées avec le NS8593, la wortmannine ou le solvant DMSO seul (A). Expression relative des protéines ERK1/2, phospho-ERK1/2 et α -SMA en fonction du traitement au NS8593 (B-a) et quantification de l'expression et du ratio de phosphorylation des protéines (B-b). Expression relative des mêmes protéines en fonction du traitement à la wortmannine par Western blot (C-a) et quantification de l'expression et du ratio de phosphorylation de ces protéines dans les cellules PS-1 (C-b). Expériences réalisées à 48h de traitement N=4 ; NS $p > 0.05$.

L'absence de modification de l'activation de ERK1/2 et de l'expression de α -SMA induite par le traitement à la wortmannine suggère qu'il n'existe pas de lien entre la voie PI3K/AKT et ERK1/2 et que le canal TRPM7 influence leur activation respectives de façon indépendante (Figure 50-C).

Il est à noter que nos résultats précédents montrent que l'inactivation du canal TRPM7 diminue le niveau de phosphorylation de la kinase GSK3- β , et augmente son niveau d'activation (GSK3- β est actif sous forme non phosphorylé). GSK3 est également connue pour inhiber la β -caténine. Hors, il a été démontré que l'inhibition de la β -caténine induit une augmentation de l'expression de α -SMA ainsi que de la synthèse de composants de la MEC par les CSH [**Kordes et al. 2008 ; Berg et al. 2010**]. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine sur le modèle des CSH permettrait de les maintenir dans un état quiescent. Cependant, nous démontrons que le traitement avec la wortmannine n'influence pas l'expression de α -SMA (Figure 52-C) suggérant que le canal TRPM7 ne régule pas la synthèse de α -SMA en agissant sur l'expression de la β -caténine par l'intermédiaire de GSK3- β .

Il a été démontré sur CMLV que l'expression de l' α -SMA est dépendante de la concentration magnésique extracellulaire. En effet, les CMLV de rat cultivées dans un milieu où la biodisponibilité en magnésium est plus importante ([10mM]_e) présentent des capacités prolifératives et migratoires accrues accompagnées d'une élévation de l'apoptose cellulaire. Cette effet s'accompagne d'une diminution de l'expression des protéines contractiles α -SMA et SM-MHC (Smooth Muscle Myosine Heavy Chain), et correspond à l'acquisition d'un phénotype inflammatoire par les CMLV [**Zhou et al. 2018**].

Nous avons démontré que le canal TRPM7 régule l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1, le siTRPM7 induit une diminution de la concentration magnésique intracellulaire (Figure 43) et une augmentation de l'expression de α -SMA (Figure 51).

C'est pourquoi nous avons étudié l'expression de l' α -SMA en fonction de la concentration magnésique extracellulaire (Figure 53).

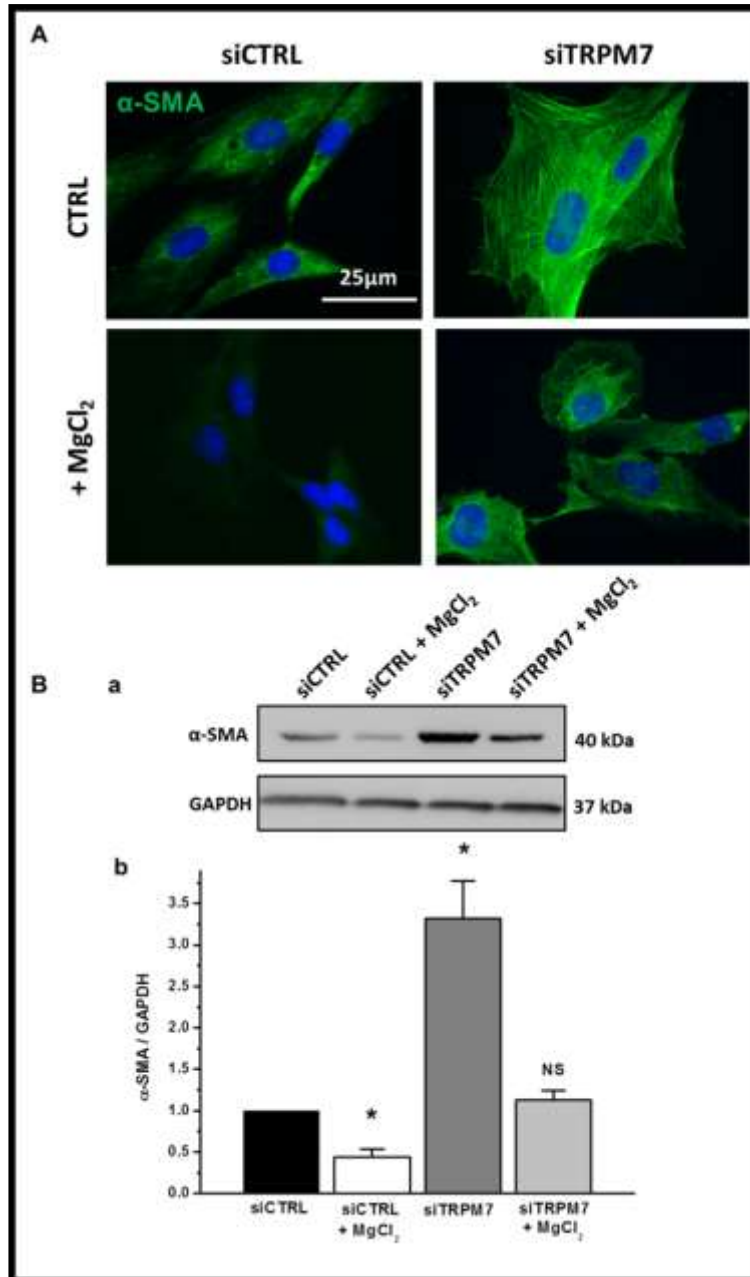


Figure 53) Rôle du magnésium sur l'expression de l'αSMA dépendante de TRPM7 :

Images de microscopie à immunofluorescence montrant l'expression de α-SMA dans les cellules PS-1 en fonction des conditions de transfection et de la concentration magnésique extracellulaire (A). Western blot montrant l'expression relative de l'α-SMA en fonction du siRNA utilisé et de la concentration magnésique extracellulaire (B-a) et quantification de l'expression de l'α-SMA dans les mêmes conditions 72h post transfection (B-b). N=4 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

Nos résultats montrent que le magnésium régule négativement l'expression de α -SMA en condition contrôle et annule l'effet positif du siTRPM7 sur la synthèse de α -SMA (Figure 53), et suggèrent que le canal TRPM7 régule l'expression de α -SMA *via* le magnésium dans les cellules PS-1. Néanmoins, nous n'avons pas vérifié le niveau d'activation de la voie ERK dans les conditions de supplémentation magnésique. D'autre part, le fait que le NS8593 échoue à réguler positivement l'expression de α -SMA et l'activation de ERK suggère que la kinase de TRPM7 puisse être impliquée dans la régulation de l'expression de α -SMA. Effectivement le NS8593 est un inhibiteur du pore du canal TRPM7 (de la fonction canal uniquement) alors que le siTRPM7 influence toutes les fonctions du chanzyme. Cette hypothèse est renforcée par l'effet inhibiteur de la supplémentation magnésique sur la synthèse de α -SMA. En effet, le magnésium est un activateur de la fonction enzymatique de TRPM7 et pourrait, dans cette configuration, compenser l'invalidation du canal TRPM7. Afin de confirmer cette hypothèse nous pourrions traiter les cellules avec des inhibiteurs de la kinase tels que la rottlerine ou le TG100-115, et quantifier l'activité de ERK1/2 et de l' α -SMA dans ces conditions.

Nous avons ensuite intégré les résultats concernant l'expression de α -SMA aux modèles d'activation par le milieu conditionné (MC) (Figure 54) de cellules d'ACP ainsi qu'au modèle cellulaire de surexpression du canal TRPM7, les cellules RLT-PSC (Figure 55).

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'expression de α -SMA et de l'activation de ERK1/2 lorsque les cellules sont traitées avec le milieu conditionné (Figure 54). Nos précédents résultats montraient que les cellules cultivées dans le MC sur-expriment le canal TRPM7 (Figure 48-B). Nous retrouvons donc un effet inhibiteur du canal TRPM7 sur l'expression de α -SMA. De la même façon la surexpression du canal TRPM7 par les cellules RLT-PSC est associée à une forte diminution de la synthèse de α -SMA liée à une baisse de l'activation des voies ERK1/2 ainsi que Smad2 comparé aux cellules PS-1 (Figure 55-A et B).

La signalisation permettant la synthèse de α -SMA dans les cellules RLT-PSC semble requérir l'activation des voies canonique et non canonique du TGFR. Nos précédents résultats concernant la prolifération cellulaire montraient également une divergence de signalisation entre les cellules PS-1 et RLT-PSC (Figure 50-E).

Nos résultats confirment que le niveau d'expression du canal TRPM7 est inversement proportionnel à celui de l' α -SMA. Nous montrons également que le niveau d'expression de α -SMA diminue avec l'activation (c'est-à-dire avec l'augmentation des capacités prolifératives) des CSP.

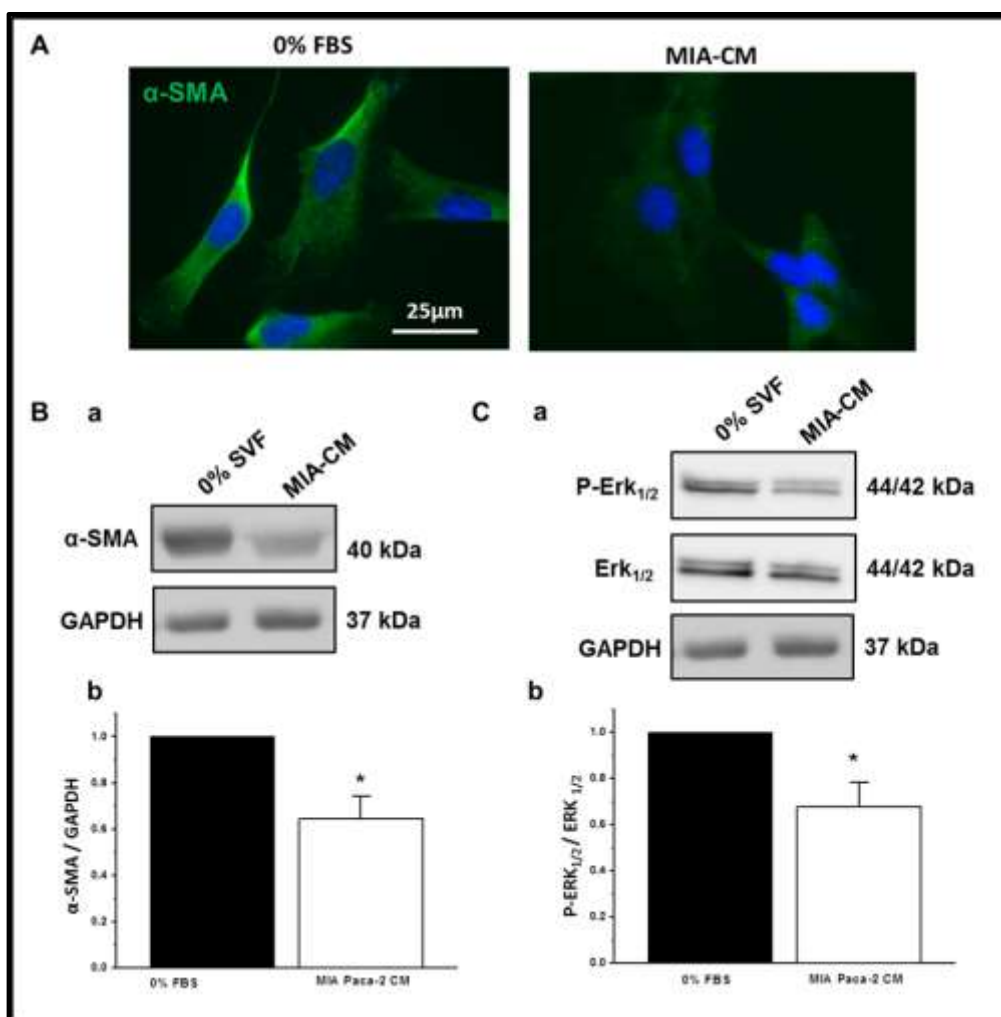


Figure 54) Effet du traitement au MC de MIA Paca-2 sur l'expression de α -SMA :

Images de microscopie à immunofluorescence montrant l'expression de l' α -SMA dans les cellules PS-1 traitées ou non pendant 96h avec le MC de cellules MIA Paca-2 (A). Western blot représentant l'expression relative de l' α -SMA en fonction du traitement (B-a) et quantification de l'expression de cette protéine dans les mêmes conditions (B-b). Western blot présentant l'expression relative des formes phosphorylées et non phosphorylées de ERK1/2 (C-a) et quantification du ratio de phosphorylation de ERK1/2 avec ou sans traitement au MC de MIA Paca-2 à t=96h (C-b). N=4 ; * $p < 0.05$.

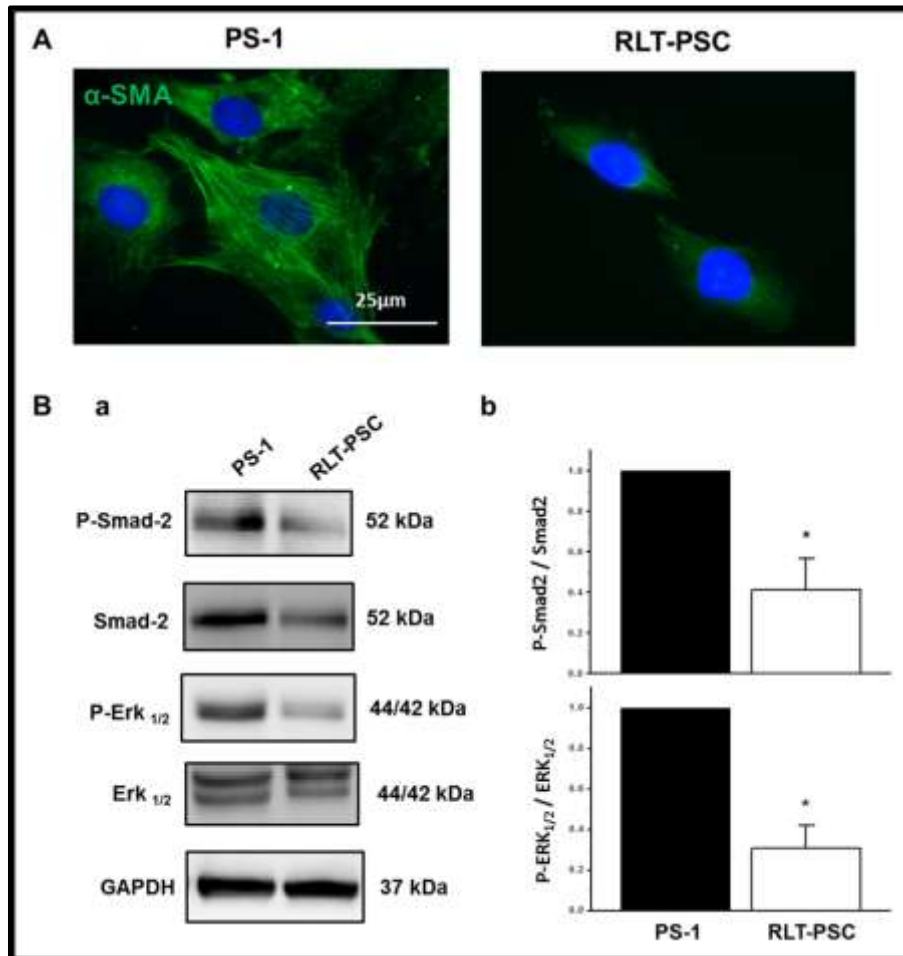


Figure 55) Role du canal TRPM7 sur l'expression de SMA dans les cellules CSP :

Images de microscopie à immunofluorescence présentant l'expression de α -SMA dans les cellules PS-1 et RLT-PSC (A). Western blot illustrant l'expression relative des protéines Smad2 et ERK1/2 dans leurs formes phosphorylées et non phosphorylées (B-a) et quantification du ratio de phosphorylation de ces deux protéines dans les deux lignées de CSP (B-b). N=4 ; * $p < 0.05$.

Les données bibliographiques sur les CAF et les CSP suggèrent que l'expression de α -SMA est importante suite à l'activation des cellules et décroît à mesure que leur agressivité augmente [Öhlund *et al.* 2017 ; Neuzillet *et al.* 2018 ; Bussart *et al.* 2016 ; Kalluri *et al.* 2016]. De plus, l'expression de α -SMA est régulée négativement par le magnésium dans les CMLV [Zhou *et al.* 2018] et nos résultats confirment ce mécanisme sur les PS-1.

Nous montrons que le canal TRPM7 est impliqué dans l'homéostasie magnésique et favorise une concentration magnésique intracellulaire élevée mais également que son niveau d'expression augmente avec l'activation et diminue lorsque les cellules tendent vers la quiescence. De plus, les PS-1 traitées à l'ATRA, exprimant moins le canal TRPM7, présentent une concentration magnésique intracellulaire plus faible que les cellules non traitées.

Nos résultats suggèrent que le niveau d'expression du canal TRPM7 associé à une augmentation de la concentration magnésique intracellulaire augmente avec le niveau d'activation des CSP. TRPM7 régulant négativement l'expression de α -SMA *via* le magnésium, nos résultats suggèrent que le niveau d'expression de α -SMA décroît avec le niveau d'activation des CSP, comme cela est décrit dans la littérature.

Nos précédents résultats démontrent que le canal TRPM7 régule la prolifération cellulaire, l'activation et la synthèse de α -SMA dans les CSP. Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de α -SMA est inversement proportionnel au niveau d'activation et aux capacités prolifératives des CSP.

Afin de confirmer nos résultats nous avons cultivé les cellules PS-1 avec 2 ng/ml de TGF- β 1 (Figure 56). Le TGF- β 1 est connu pour induire la synthèse de α -SMA à cette concentration. Il s'agit du facteur fibrogène le plus connu dans l'activation du stroma pancréatique [Ohnishi *et al.* 2004].

Nos résultats ne montrent aucune variation de l'expression du canal TRPM7 suite au traitement avec 2ng/ml de TGF- β 1 (Figure 56-A). Nous montrons également que le TGF- β 1 induit une augmentation de l'expression de α -SMA exprimée sous forme fibrillaire (Figure 56 B et C), accompagnée d'une augmentation de l'activation de la voie ERK (Figure 56 D). Le traitement au TGF- β 1 induit également une diminution de la prolifération des cellules PS-1 (Figure 56-E) avec une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Figure 56-F) et une diminution de l'expression de CDK2 et PCNA (Figure 56-G).

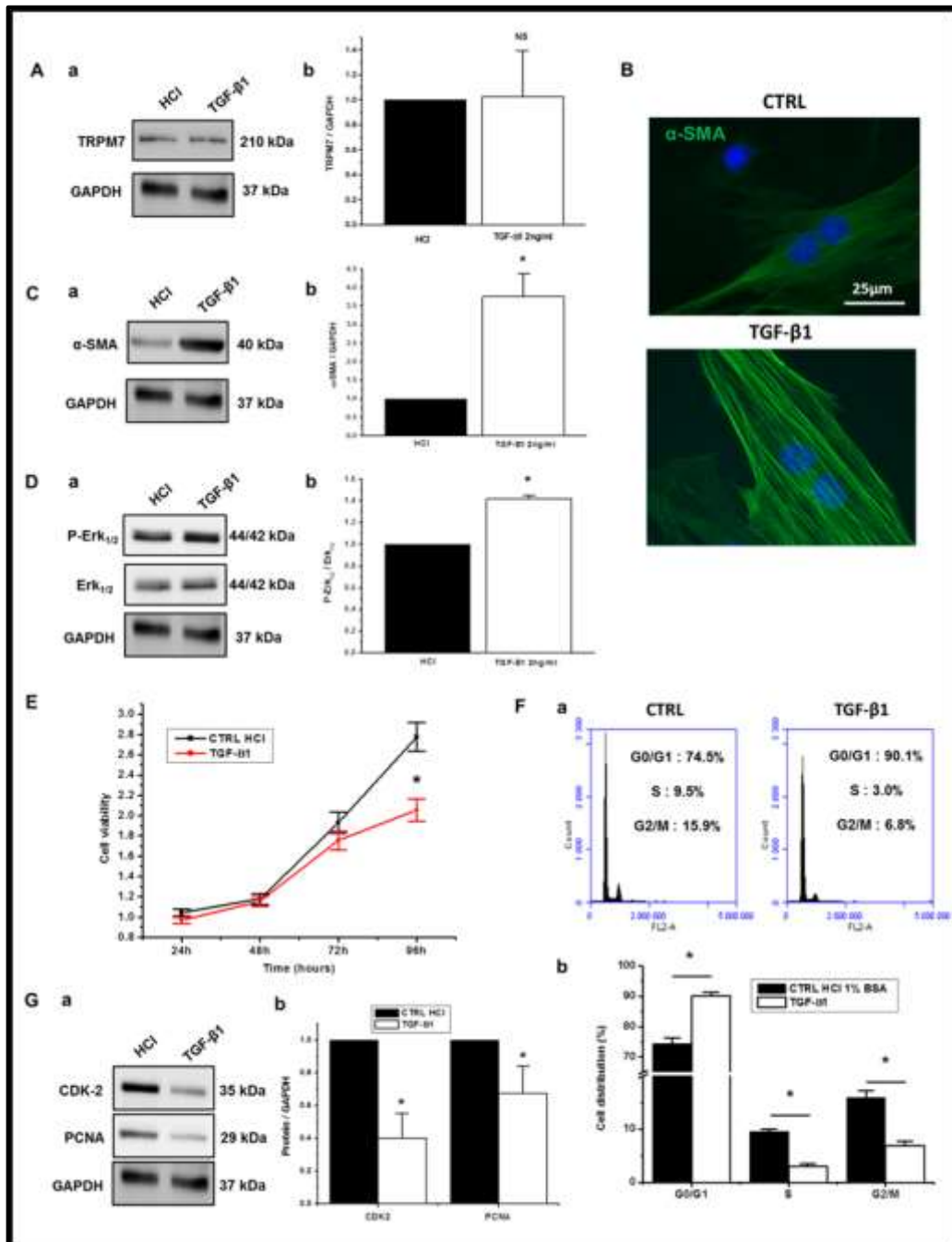


Figure 56) Effet du TGF sur l'expression de SMA et sur la prolifération des cellules PS-1 :

Western blot représentant l'expression du canal TRPM7 dans les cellules PS-1 en fonction du traitement au TGF-β1 (A-a) et quantification de l'expression du chanzyme par rapport à la GAPDH dans les mêmes conditions (A-b). Images de microscopie à fluorescence présentant l'expression de α-SMA en fonction du traitement au TGF-β1 ou au solvant seul (B). Western blot présentant l'expression relative de α-SMA avec et sans traitement au TGF-β1 (C-a) et quantification de son expression rapportée à la GAPDH (C-b). Western blot représentant l'expression relative des formes phosphorylées et non phosphorylées de ERK1/2 en fonction du traitement (D-a) et quantification du ratio de phosphorylation de ERK1/2 (D-b). Graphique de la cinétique de viabilité cellulaire des cellules PS-1 en fonction du traitement (E) Profils de cycle cellulaire des cellules PS-1 traitées ou non (F-a) et quantification du pourcentage de répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire (F-b). Western blot représentant l'expression relative des protéines CDK2 et PCNA en fonction du traitement (G-a) et quantification de leur expression par rapport à la GAPDH (G-b). Les cellules sont traitées pendant 96h ; N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$.

Les résultats obtenus montrent que le traitement au TGF- β 1 induit un effet similaire à l'invalidation du canal TRPM7 sur la prolifération cellulaire et la synthèse de α -SMA.

En effet, le traitement avec 2 ng/ml de TGF- β 1 pendant 96h induit une augmentation de l'expression de α -SMA et de l'activation de ERK1/2 sans influencer l'expression du canal TRPM7 dans les cellules PS-1 (Figure 56-A,B,C et D). L'augmentation de l'expression de α -SMA est associée à une diminution de la prolifération cellulaire à 96h liée à l'accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et à la diminution de l'expression de CDK2 et PCNA (Figure 56-E,F et G).

Dans la mesure où le TGF- β 1 n'influence pas l'expression du canal TRPM7, il est possible que l'augmentation de l'expression de α -SMA et les modifications morphologique engendrées défavorisent la prolifération cellulaire. Aussi, nous pensons que l'invalidation du canal TRPM7 exerce un effet inhibiteur direct sur la prolifération cellulaire en réduisant l'activation de PI3K/AKT, ainsi qu'un effet indirect lié à la régulation de l'expression de α -SMA.

Il a été démontré dans la littérature que traiter les cellules RLT-PSC avec 5 et 10 ng / ml de TGF- β 1 induit une augmentation de l'expression de α -SMA associée à une diminution de la prolifération cellulaire, avec accumulation des cellules en phases G0/G1 du cycle cellulaire [**Jesnowski et al. 2005**]. De manière générale le TGF- β 1 est connu pour induire une augmentation de la synthèse d'éléments de la MEC par les CSP [**Luttenberger et al. 2000 ; Schneider et al. 2001**]. Ce phénomène est associé à la contractilité des cellules lié à l'expression de α -SMA, et permet la réparation tissulaire. Nos résultats ainsi que les données bibliographiques suggèrent que le canal TRPM7 régule le phénotype prolifératif des CSP en inhibant le phénotype sécrétoire.

L'activation des CSP est principalement caractérisée par l'expression de l' α -SMA, qui permet de différencier les CSP activées des CSP quiescentes. Néanmoins il existe des variations d'expression de α -SMA entre les différentes sous-populations de CSP. Il a été démontré que les sous-types de CSP mis en évidence possèdent un profil d'expression de α -SMA variable. En effet, certains sous-types expriment beaucoup l' α -SMA et d'autres très peu. Le niveau d'expression de l' α -SMA est inversement proportionnel au potentiel prolifératif du sous-type de CSP [**Neuzillet et al. 2018**].

Ohlund et collaborateurs ont également démontré l'existence d'un sous-type dit « inflammatoire » hautement sécrétoire exprimant très faiblement l' α -SMA, et d'un sous-type qualifié de « myofibroblastique » caractérisé par une expression de α -SMA importante [Öhlund *et al.* 2017]. Un phénomène similaire est observable sur les fibroblastes, myofibroblastes et CAF. Il a été démontré que les fibroblastes associés à la régénération tissulaire, les WAF (wound-healing associated fibroblasts), expriment l' α -SMA de même façon que les CAF. Aucune quantification comparative de l'expression du marqueur α -SMA n'a été réalisée entre les deux types évoqués mais leurs phénotypes ont été évalués. Les CAF sont décrits comme étant faiblement contractiles alors que les WAF le sont fortement. De plus les CAF sont hautement prolifératifs et sécrétoires alors que les WAF ne le sont pas [Kalluri *et al.* 2016]. L' α -SMA est une protéine impliquée principalement dans la contraction cellulaire. Il est probable que les variations phénotypiques soient liées à une diminution de l'expression de α -SMA, les CAF étant dans un niveau d'activation supérieur aux WAF.

Enfin, une autre étude réalisée sur la caractérisation des CAF présente 5 sous-types différents classés en fonction des marqueurs qu'ils expriment et de leur niveau d'agressivité. Les 2 sous-types faiblement agressifs n'expriment pas l' α -SMA, le sous-type intermédiaire l'exprime fortement et le sous-type le plus agressif l'exprime de façon beaucoup moins importante [Bussart *et al.* 2016]. Ces résultats montrent que dans les fibroblastes comme les CSP, il existe différents patterns d'expression de l' α -SMA directement relié à un phénotype spécifique et à l'agressivité.

Ces résultats suggèrent que le canal TRPM7 puisse être le régulateur principal de l'expression de α -SMA dans les CSP. Les différences d'expression de α -SMA entre les différents sous-types de CSP et de CAF pourraient alors être la conséquence d'une variation de l'expression de TRPM7. Confirmer ces résultats démontrerait que le canal TRPM7 est un biomarqueur majeur de l'activation ou de l'agressivité des CSP.

Les résultats précédents montrent que l'inactivation de TRPM7 par un siRNA inhibe la prolifération des PS-1 et augmente l'expression de α -SMA. Le TGF- β 1 est une des principales cytokines fibrogènes ainsi que le principal activateur de la synthèse de α -SMA. De nombreuses études démontrent que le TGF favorise la sécrétion de MEC

et la contractilité des CSP mais cela s'effectue au détriment de la prolifération cellulaire [Chen *et al.* 2016]. L' α -SMA, en s'associant aux fibres de stress *via* la voie de RhoA et/ou MLCK, permet de générer une force de contraction élevée et favorise la réparation tissulaire.

La prolifération cellulaire, et plus spécifiquement la phase de mitose, est un mécanisme qui nécessite une totale réorganisation du cytosquelette. On parle d'arrondissement cellulaire pour décrire la conformation arrondie adoptée par la cellule mitotique [Cramer *et al.* 1997 ; Atilla-Gokcumen *et al.* 2010 ; Lancaster *et al.* 2013]. Il a notamment été démontré que l'arrondissement cellulaire nécessaire à la mitose demande la dissociation des fibres de stress [Mitchison *et al.* 1992 ; Matthews *et al.* 2012]. En cas de modification de l'architecture de la cellule, le processus mitotique est directement influencé et peut être perturbé [Lancaster *et al.* 2014]. Il a été démontré que les fibroblastes cultivés sur matrice de synthèse voient leur prolifération diminuer, et que l'utilisation d'inhibiteurs de la contractilité (inhibiteurs de RhoA et de MLCK) permet d'abolir l'effet antiprolifératif induit par la matrice sur les fibroblastes [Thakar *et al.* 2008].

Le fait d'induire une surexpression de SMA aboutit à une diminution de la motilité et de la prolifération cellulaire des fibroblastes de rat 3Y1 [Ronnov-Jenssen *et al.* 1996 ; Okamoto-Inoue *et al.* 1999]. Des résultats similaires ont été obtenus sur Cellules Musculaire Lisse Vasculaire (CMLV). Dans cette étude, la surexpression de SMA inhibe Rac1, diminuant à la fois les capacités prolifératives et migratoires des CMLV. La surexpression de Rac1 lève le blocage en phase G0/G1 du cycle cellulaire induit par la surexpression de SMA [Chen *et al.* 2016]. Ces résultats montrent que l' α -SMA peut réguler l'expression d'autres acteurs moléculaires impliqués dans la prolifération cellulaire et agit de façon indirecte sur ce processus.

D'autres travaux, concernant les CMLV, ont mis en évidence le lien entre niveau d'expression de α -SMA et contractilité. Lorsque la synthèse de α -SMA est inhibée les propriétés contractiles des CMLV diminuent à mesure que leurs capacités à proliférer et à migrer augmentent [Hao *et al.* 2003]. De plus, l'inhibition de Rac1 induit l'acquisition d'un phénotype stellaire par les CMLV, alors que la surexpression de Rac1 permet d'annuler le phénomène de stéllation [Wong *et al.* 2001 ; Pelletier *et al.* 2005].

L'expression de α -SMA est contrôlée par la voie du TGF- β 1 étant considéré comme un facteur fibrotique et anti-prolifératif. Des travaux réalisés sur des coupes humaines d'anévrisme abdominal aortique (AAA) montrent que les régions lésées ayant un niveau d'expression élevé de TGF- β 1 présentent une diminution de la densité en CMLV. Cet effet est lié à une diminution de la prolifération et de la survie des cellules vasculaire induite de façon concentration-dépendante par le TGF- β 1 **[Fukui et al. 2003]**. Le TGF- β 1 sécrété par les CSH est également connu pour exercer un effet antiprolifératif sur les hépatocytes dans le cadre de la régénération du tissu hépatique. Il régule également l'activation des CSH en induisant la synthèse de α -SMA **[Chen et al. 2012 ; Karkampouna et al. 2012]**.

Ces données suggèrent que les processus de contractilité et de prolifération requièrent l'implication du cytosquelette mais dans des conformations différentes. L'expression de α -SMA et la stimulation au TGF- β 1 pourrait favoriser l'orientation des CSP vers un phénotype contractile au détriment de l'expression du phénotype prolifératif.

Tenant compte de ces données, nous pensons que le canal TRPM7 régule positivement la prolifération cellulaire, outre l'effet direct sur le cycle cellulaire et l'activation de la voie PI3K/AKT, en inhibant l'expression des protéines contractiles α -SMA et vimentine. Le canal TRPM7 pourrait alors octroyer aux cellules PS-1 une morphologie arrondie facilitant la prolifération cellulaire.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'expression du principal marqueur d'activation des CSP est directement régulée par le canal TRPM7 de façon magnésium dépendante. L'expression des marqueurs de CSP vimentine et desmine varie également avec l'expression du canal TRPM7. Ces résultats suggèrent que le canal TRPM7 régule l'acquisition d'un phénotype prolifératif par les CSP.

CONCLUSION et PERSPECTIVES :

Partie 1

Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération des cellules stellaires pancréatiques humaines activées.

CONCLUSION :

Au cours de ce travail nous avons démontré que 1) Le canal TRPM7 régule l'entrée cationique et l'homéostasie magnésique dans les CSP humaines activées ; 2) le canal TRPM7 est impliqué dans la prolifération des CSP humaines activées en permettant la transition G1-S médiée par CDK2 et PCNA *via* l'activation de la voie PI3K/AKT et l'inhibition du facteur P53 et de la kinase GSK3- β de façon magnésium dépendante ; 3) Le niveau d'expression du chanzyme TRPM7 varie en fonction du niveau d'activation des CSP, une forte expression de TRPM7 étant corrélée à un niveau d'activation élevé ainsi qu'à une augmentation des capacité prolifératives des CSP ; 4) Le canal TRPM7 contrôle négativement l'expression de l' α -SMA en inhibant l'activation de la voie ERK, et l'inhibition magnésium dépendante de l'expression de α -SMA par TRPM7 pourrait également favoriser le phénotype prolifératif des CSP (Figure 57).

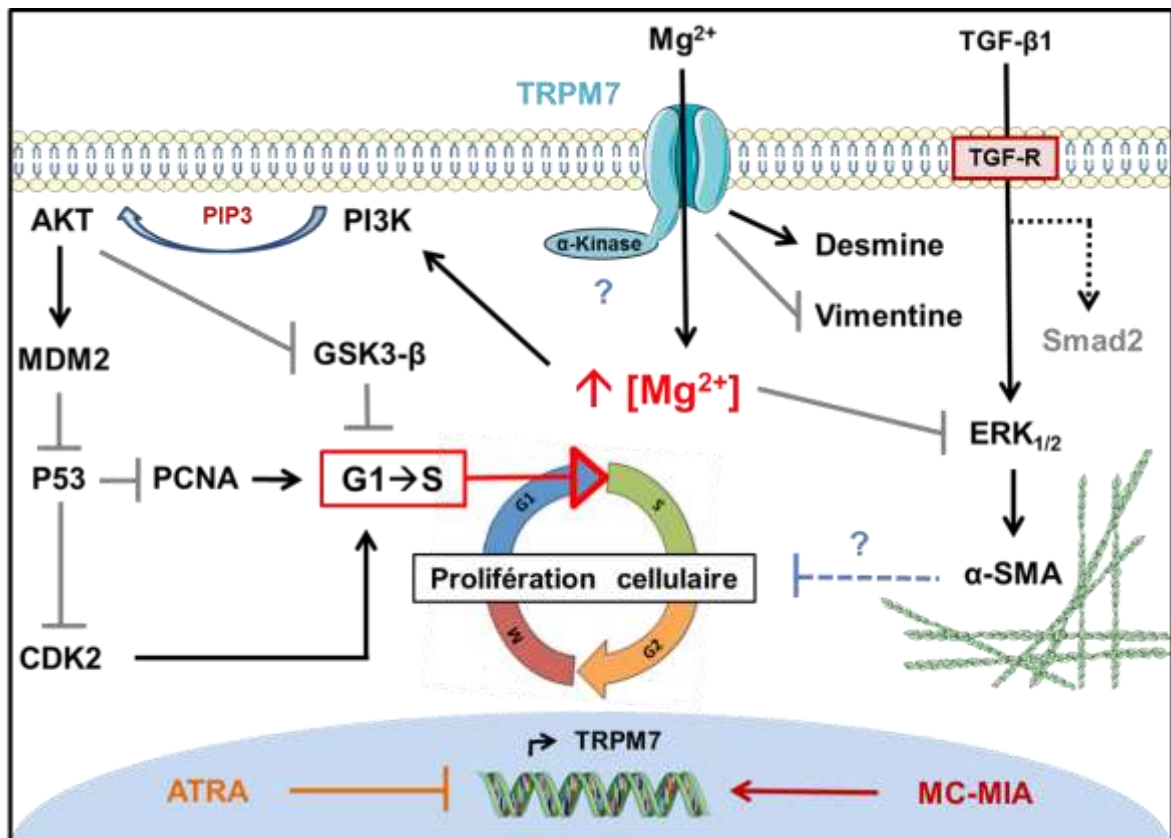


Figure 57) Schéma récapitulatif du rôle de TRPM7 dans le maintien de l'homéostasie magnésique et la prolifération des CSP humaines activées :

Les effets putatifs ou les perspectives directes sont représentés en bleu ciel et accompagnés d'un point d'interrogation.

PERSPECTIVES :

1) Rôle du canal TRPM7 dans la survie des CSP :

Au cours de nos travaux nous nous sommes également intéressés au rôle du canal TRPM7 dans la survie des cellules PS-1 (Figure 58).

Les résultats concernant la survie cellulaire montrent que le canal TRPM7 régule négativement l'apoptose par la voie mitochondriale *via* Bax/Bcl-2 de façon indépendante de la caspase-3 (Figure 58-A,C et E). Le magnésium exerce un effet positif sur l'apoptose uniquement lorsque le canal TRPM7 est invalidé et non en condition siCTRL (Figure 58-F). De plus, l'inhibiteur pharmacologique du canal n'a aucun effet sur la survie des cellules PS-1 (Figure 58-B et D). Le NS8593 étant un bloqueur du pore du canal il est possible que la fonction kinase de TRPM7 reste fonctionnelle même lorsque la fonction canal est inhibée. Ces résultats suggèrent que le canal TRPM7 puisse être impliqué dans la régulation de la survie des cellules PS-1 *via* son domaine kinase.

La kinase de TRPM7 est connue pour être impliquée dans l'apoptose cellulaire notamment lorsque celle-ci est clivée par la caspase 3 [Krapivinsky *et al.* 2014]. Aucune autre caspase associée à l'apoptose par la voie intrinsèque n'est connue à ce jour pour cliver le domaine kinase de TRPM7, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la caspase-3. Cependant nos résultats ne montrent pas de variation de l'expression de la caspase-3, ce qui suggère qu'aucun mécanisme de clivage du canal par cette caspase n'existe dans les cellules PS-1 (Figure 58-E). La caspase-8 est également connue pour cliver le domaine kinase du canal TRPM7, néanmoins cette caspase est associée aux voies apoptotiques extrinsèques [Desai *et al.* 2012]. L'activation des voies apoptotiques extrinsèques n'implique la perméabilisation de la membrane mitochondriale que dans le cas de l'activation du facteur Bid. Dans la mesure où nos résultats présentent une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 nous devrions nous intéresser à l'expression de la caspase 8 ainsi que des formes Bid et tBid. Ces résultats permettraient de valider ou non l'hypothèse du clivage de la kinase de TRPM7.

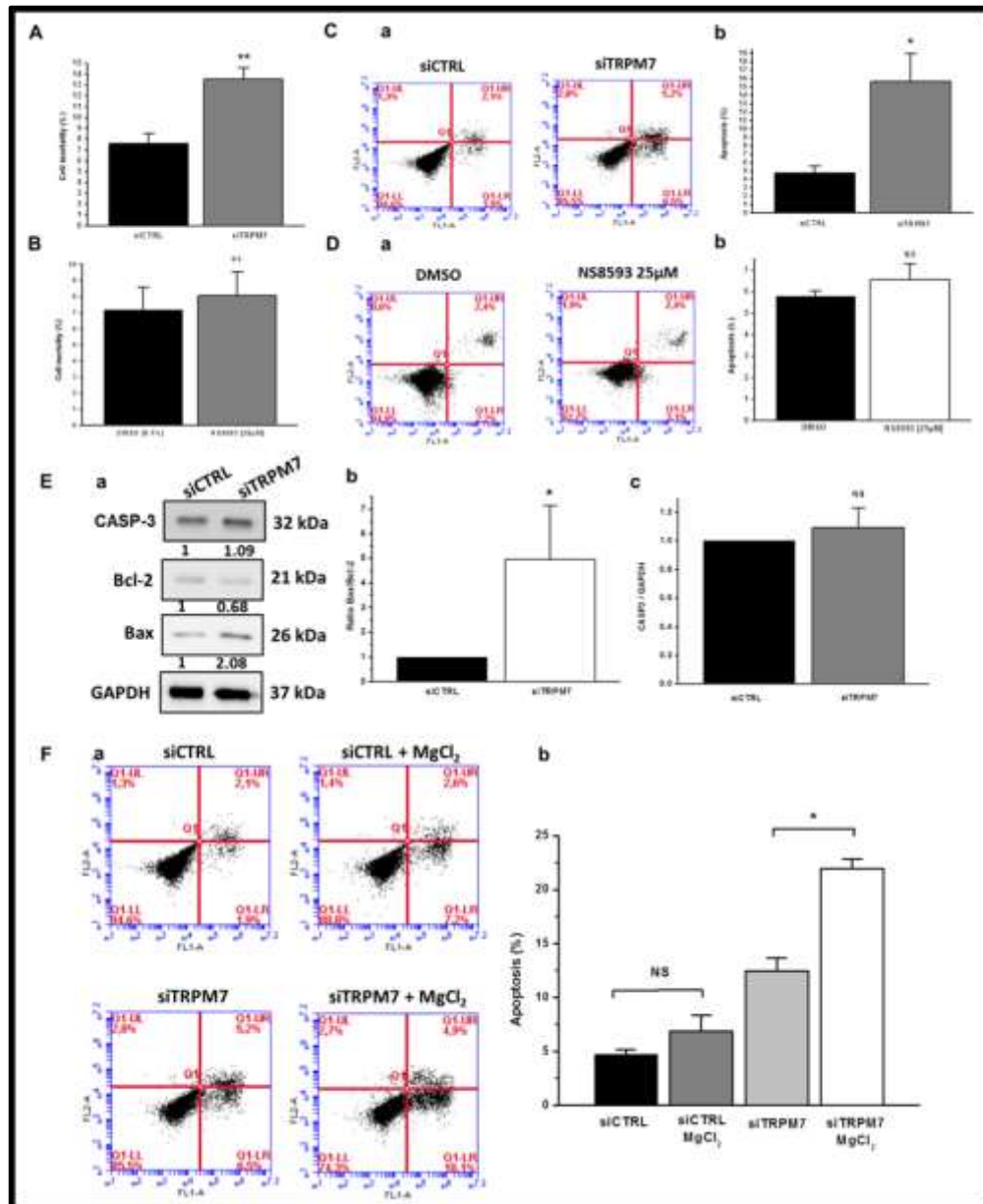


Figure 58) Rôle du canal TRPM7 dans la survie des cellules PS-1 :

Quantification du pourcentage de mortalité estimé par test au bleu trypan sur les cellules PS-1 transfectées avec le siTRPM7 ou le siCTRL (A) ou traitées avec le NS593 (B). Représentation des populations cellulaires apoptotiques en fonction du siRNA transfecté (C-a) et quantification du pourcentage de cellules PS-1 en apoptose dans les mêmes conditions (C-b). Représentation de la population de cellule apoptotique en fonction du traitement au NS593 (D-a) et quantification du pourcentage d'apoptose des cellules PS-1 dans les mêmes conditions (D-b). Western blot présentant l'expression des protéines Bcl-2, Bax et de la caspase-3 en fonction de la transfection des cellules PS-1 (E-a) quantification du ratio apoptotique Bax/Bcl-2 (E-b) et de l'expression de la caspase-3 par rapport à la GAPDH dans les mêmes conditions (E-c). Représentation de la population de cellules PS-1 en apoptose en fonction du siRNA et de la concentration magnésique extracellulaire (F-a) et quantification du pourcentage d'apoptose cellulaire dans les mêmes conditions (F-b). 72h post transfection ; N=3 ; NS $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Il existe néanmoins d'autres mécanismes de régulation de l'apoptose impliquant la kinase de TRPM7 sans que celle-ci ne soit clivée. Effectivement, il a été démontré que la kinase de TRPM7 régule le transit nucléaire de l'annexine A1 *via* la chaîne lourde de la myosine II A induisant l'apoptose des cellules neuronales en condition hypoxique [Zhao *et al.* 2015]. Nos résultats montrent, par ailleurs, que le canal TRPM7 régule l'expression d'éléments du cytosquelette tels que la vimentine, la desmine ou encore l' α -SMA (Figure 51-A et B). Il est probable que le chanzyme TRPM7 puisse réguler l'expression et/ou la polymérisation de la myosine II A *via* son domaine kinase et influence la survie des cellules PS-1. L'utilisation d'inhibiteur de la kinase tels que la rottlerine ou le TG100-115 combinée à l'analyse de la mortalité cellulaire en cytométrie de flux nous permettrait de confirmer cette hypothèse.

La surexpression de formes tronquées du canal TRPM7 ne possédant pas de domaine kinase nous permettrait également de confirmer le rôle de la kinase dans la survie des cellules PS-1. Si la kinase du canal TRPM7 est impliquée dans la survie des cellules PS-1, la surexpression d'une version dépourvue de kinase devrait mimer les effets du siTRPM7 sur la survie cellulaire sans altérer la prolifération ni l'homéostasie magnésique.

Nous montrons également que la supplémentation magnésique engendre une importante mortalité des cellules PS-1 uniquement lorsque celles-ci sont transfectées avec le siTRPM7 mais pas en condition contrôle (Figure 58-F). Le magnésium est connu pour engendrer l'apoptose cellulaire à de fortes concentrations [Zhou *et al.* 2018]. Ces résultats suggèrent que le magnésium n'est pas impliqué dans le maintien de la survie des cellules PS-1.

L'effet additif exercé par le magnésium sur l'apoptose induite par le siTRPM7 pourrait suggérer que le calcium passant par le canal TRPM7 régule la survie cellulaire. En effet, le magnésium étant le principal antagoniste du calcium, une forte concentration magnésique extracellulaire pourrait engendrer une diminution de l'entrée de calcium *via* le canal TRPM7. Néanmoins, la supplémentation magnésique seule n'engendre pas d'effet apoptotique associé au siCTRL remettant en cause l'hypothèse de la compétition calcium/magnésium dans les cellules PS-1.

L'hypothèse de l'implication du domaine kinase de TRPM7 dans la survie des cellules PS-1 semble plus probable. Nous devrions étudier la survie cellulaire avec

les inhibiteurs de la kinase du canalyse TRPM7 comme évoqué précédemment et déterminer le mécanisme apoptotique impliqué.

2) Rôle du canal TRPM7 dans la migration et l'invasion des CSP :

Au cours de ce travail, nous avons également démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans la migration et l'invasion basale des cellules PS-1 (Figure 59). Néanmoins, il ne s'agit que de résultats préliminaires n'impliquant pas la mise en évidence de voie de signalisation. Le canal TRPM7 est connu pour être impliqué dans les mécanismes de migration et d'invasion cellulaire des cellules cancéreuses. Des précédents travaux du laboratoire réalisés dans les cellules d'ACP montrent que la migration et l'invasion dépendantes de TRPM7 sont des processus nécessitant le magnésium [Rybarczyk *et al.* 2012 et 2017]. La régulation du processus invasif par le canal TRPM7 dans les cellules d'ACP s'effectue en activant la MMP-2 *via* Hsp90 α et uPA [Rybarczyk *et al.* 2017]. Les résultats obtenus au cours de nos travaux montrent que le canal TRPM7 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1 (Figure 43). Nos résultats montrent également que le canal TRPM7 influence l'expression de protéines du cytosquelette telles que la vimentine, la desmine ou encore l' α -SMA, et pourrait moduler la morphologie cellulaire dans les cellules PS-1. De plus, Il a été démontré que les CSP expriment la MMP-2 et que l'expression de cette protéase augmente lorsque les cellules sont traitées avec le milieu conditionné de cellules cancéreuses [Tjomsland *et al.* 2016]. C'est pourquoi, il est possible que le canal TRPM7 régule la migration et l'invasion des cellules PS-1 par une voie dépendante du magnésium. Afin de vérifier cette hypothèse il serait intéressant de faire migrer les cellules PS-1 transfectées avec le siTRPM7 dans un milieu contenant 10 mM de MgCl₂. Nous devrions observer une compensation de l'inhibition de la migration cellulaire induite par le siTRPM7 lorsque les cellules migrent dans un milieu contenant 10 mM Mg²⁺ si le magnésium est impliqué dans ce processus. Nous devrions également analyser la morphologie des cellules transfectées ou non avec le siTRPM7 et en condition de supplémentation

magnésique, ainsi que l'expression des acteurs de la migration cellulaire (intégrines, paxiline, FAK etc.).

Concernant l'invasion cellulaire, la voie d'activation de la MMP-2 impliquant Hsp90 et uPA devra être investiguée dans les mêmes conditions expérimentales afin de caractériser le processus invasif dépendant du canal TRPM7.

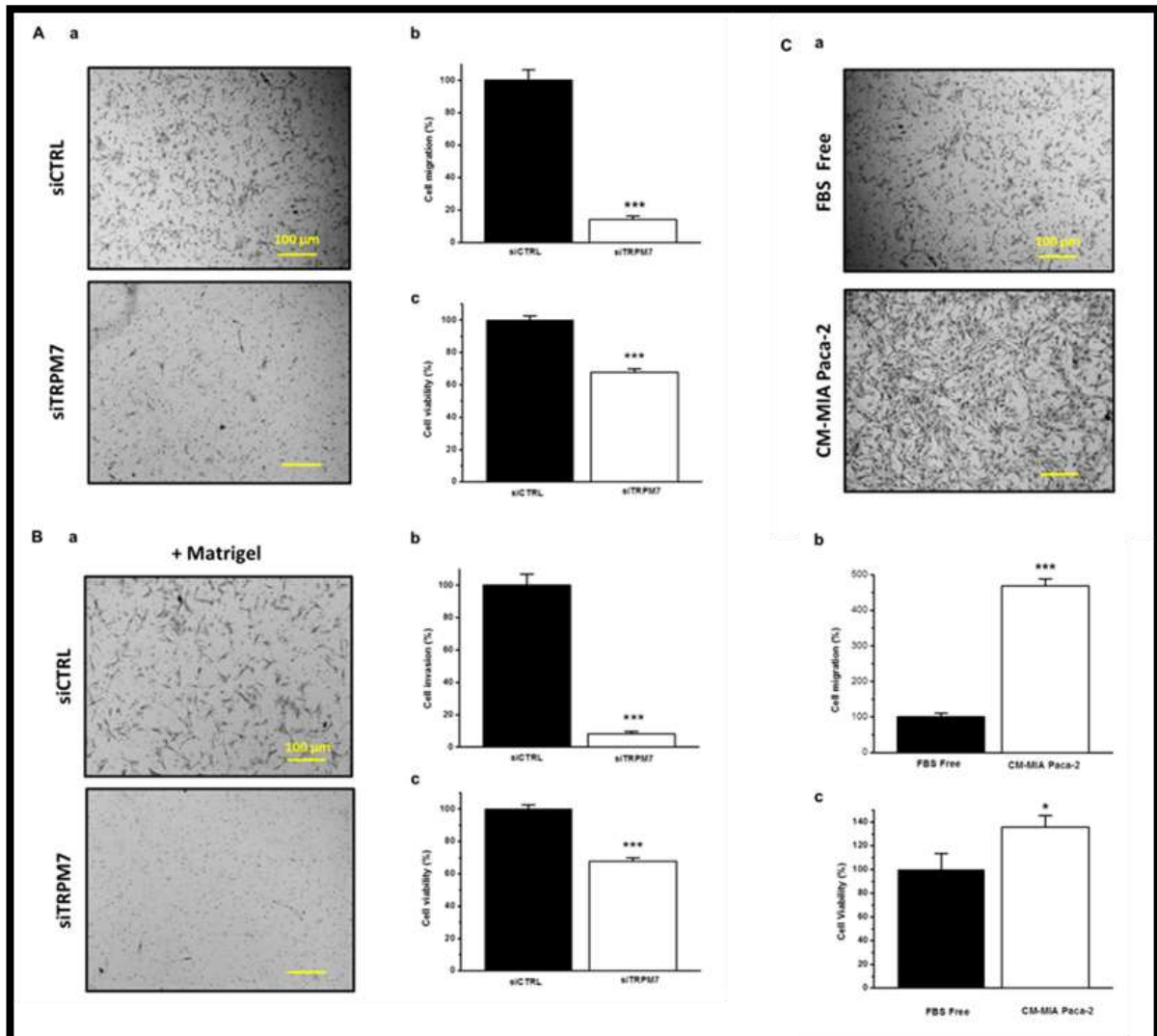


Figure 59) Rôle du canal TRPM7 dans la migration et l'invasion des CSP :

Images représentant les cellules PS-1 ayant migré en fonction du siRNA utilisé (A-a), quantification du pourcentage de cellules migrantes (A-b) et de la viabilité cellulaire globale dans les mêmes conditions (A-c). Images représentant l'invasion cellulaire en fonction du siRNA utilisé (B-a), quantification du pourcentage de cellules invasives (B-b) et de la viabilité cellulaire globale dans les mêmes conditions (B-c). Images de migration cellulaire en insert de Boyden des cellules PS-1 traitées ou non au MC de cellules MIA Paca-2 (C-a) quantification du pourcentage de migration cellulaire (C-b) et quantification de la viabilité des cellules PS-1 dans les mêmes conditions (C-c). t=48h post transfection ; N=3 ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Nous avons également montré que les cellules PS-1 migrent d'avantage dans le MC de cellules d'ACP (Figure 59-C), confirmant des données de la littérature montrant que les MC de cellules cancéreuses sont connus pour augmenter la migration des CSP [Yoshida *et al.* 2005 ; Schneiderhan *et al.* 2007]. Il est à noter que le milieu conditionné est répartie de façon homogène entre le puit et l'insert au cours de l'expérimentation afin de s'affranchir des mécanismes de chimiotactisme. Néanmoins, nos précédents résultats montrent que l'expression du canal TRPM7 augmente au cours du traitement avec le MC de cellule MIA Paca-2. Il est donc possible que l'augmentation de la migration soit directement liée à l'augmentation de l'expression du canal TRPM7 induite par le MC de cellules d'ACP. Afin de confirmer cette hypothèse l'expression du canal TRPM7 devra être quantifiée en parallèle de la migration induite par le MC de MIA Paca-2.

Nous pourrions également inclure les cellules RLT-PSC et les cellules PS-1 traitées avec 1 μ M d'ATRA pendant une semaine à notre étude afin de confirmer le rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition des capacités invasives et migratoires des CSP activées.

Ces résultats préliminaires constituent une base intéressante pour l'étude du rôle du canal TRPM7 dans la migration et l'invasion des CSP. Le rôle des canaux ioniques, notamment des canaux TRP, a déjà été observé dans le processus migratoire sur le modèle des CSP [Fels *et al.* 2016 ; Nielsen *et al.* 2017 ; Storck *et al.* 2017] Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée sur le rôle du canal TRPM7 et du magnésium sur la migration des CSP.

3) Caractérisation électrophysiologique du canal TRPM7 et rôle du magnésium dans l'activation des CSP :

Nos résultats montrent que le canal TRPM7 régule l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1 (Figure 43), en effet, l'inhibition ou l'invalidation du canal TRPM7 ainsi que l'induction de la quiescence par l'ATRA (Figure 47-F) diminuent la concentration magnésique intracellulaire des cellules PS-1. Nos résultats mettent

également en évidence le lien entre l'expression du canal TRPM7 et les capacités prolifératives des CSP. Néanmoins, aucune caractérisation électrophysiologique du canal n'a été réalisée dans nos modèles d'études. Il serait intéressant de quantifier l'activité (expression fonctionnelle) du canal TRPM7 dans les conditions évaluées au cours de ce travail (siTRPM7, ATRA, MC, RLT-PSC). Les résultats permettraient de relier l'expression protéique du canal à son expression fonctionnelle, et d'établir un lien entre le niveau d'activité de TRPM7 et les capacités prolifératives et le niveau d'activation des CSP.

Les cellules PS-1 exprimant également le canal TRPM6 (Figure 37-B), il serait intéressant de pouvoir discriminer l'apport des homotétramères de TRPM7 et des hétérotétramères TRPM7/TRPM6 dans la signalisation proliférative des cellules PS-1. Une caractérisation des courants ioniques enregistrés dans les PS-1 devrait être réalisée après transfection d'un siTRPM6. Nous devrions également investiguer le rôle du canal TRPM6 dans la prolifération et l'activation des CSP avec les méthodes utilisées pour caractériser le rôle du canal TRPM7 dans ces processus.

D'autre part, il a été démontré que les cellules cancéreuses possèdent une concentration magnésique intracellulaire forte comparé aux cellules saines [Taylor *et al.* 1991]. Néanmoins, aucune mesure de la concentration magnésique présente dans le stroma tumoral n'a été effectuée à ce jour.

Il est possible que la concentration magnésique augmente également avec l'activation des CSP et que le canal TRPM7 soit directement impliqué dans ce processus. Nous avons démontré que le canal TRPM7 régule l'homéostasie magnésique dans les cellules PS-1. Le niveau d'expression du canal et la concentration magnésique cytosolique diminuent avec l'induction de la quiescence, ce qui suggère que la concentration magnésique liée à l'expression du canal TRPM7 puisse réguler l'activation des CSP.

Néanmoins seules la transfection avec le siTRPM7 et l'induction de la quiescence par un traitement à l'ATRA ont été investiguées en imagerie cationique. Il paraît primordial d'étendre ces tests à l'ensemble des modèles étudiés et notamment de réaliser une étude comparative du niveau de fluorescence magnésique entre les cellules PS-1 et RLT-PSC ainsi qu'entre les PS-1 traitées et non traitées avec le MC de cellules cancéreuses. Dans le cas où le niveau de fluorescence magnésique

suive le niveau d'expression de TRPM7, les résultats obtenus permettraient de relier le niveau d'activation et les capacités prolifératives des CSP à la concentration magnésique intracellulaire, en plus de confirmer que le canal TRPM7 est le principal régulateur de l'homéostasie magnésique dans ce type cellulaire.

4) Rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition d'un phénotype agressif par les CSP et intégration des résultats au modèle *in situ* :

Il a été démontré qu'il existe plusieurs sous-types de CSP, classées en fonction des marqueurs exprimés et de leur niveau d'agressivité. De façon générale, la caractérisation des sous-types de CSP par Neuzillet et collaborateurs montre que le niveau d'expression de SMA et de la vimentine est inversement proportionnel aux capacités prolifératives des CSP [Neuzillet *et al.* 2018].

Nos résultats montrent que le canal TRPM7 est impliqué dans la prolifération cellulaire et inhibe l'expression de SMA et de la vimentine, l'étude comparative des lignées PS-1 et RLT-PSC confirme le lien existant entre prolifération et faible niveau d'expression de α -SMA / vimentine. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques et suggèrent que le canal TRPM7 pourrait être l'effecteur responsable de la corrélation inverse décrite entre l'expression de l' α -SMA et la prolifération des CSP [Neuzillet *et al.* 2018]. C'est pourquoi il serait intéressant de confirmer nos résultats *in situ*.

Les CSP sont caractérisées par un grand nombre de marqueurs (GFAP, desmine, vimentine, SMA), la pluralité du marquage rend difficile l'analyse *in situ*. Néanmoins, des travaux récents ont permis de mettre au point des marqueurs précis et spécifiques concernant les différents sous-types de CSP. Neuzillet et collaborateurs ont mis en évidence l'existence de 4 sous-types de CSP différents caractérisés en fonction de marqueurs uniques tels que la myosine 11 ou la périostine. Il a notamment été démontré que l'expression de la myosine 11 est spécifique du sous-type de CSP exprimant fortement l' α -SMA et la vimentine mais ayant de faibles capacités prolifératives. A l'inverse les CSP exprimant la périostine prolifèrent

fortement mais possèdent une faible expression de l' α -SMA et de la vimentine **[Neuzillet et al. 2018]**.

L'évaluation de l'intensité du marquage pour TRPM7 en fonction du marquage des différents sous-types de CSP nous permettrait de relier l'expression du canal à la prolifération des CSP. Enfin, pour chaque sous-type possédant des capacités prolifératives et une expression de α -SMA différente, l'attribution d'un score de marquage pour TRPM7 pourrait confirmer son rôle dans la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de la synthèse de α -SMA dans les CSP. Ces résultats nous permettraient de confirmer le lien entre TRPM7, α -SMA et prolifération cellulaire que nous avons précédemment décrit et de proposer le canal TRPM7 comme marqueur du phénotype prolifératif dans les CSP.

D'autre part, les différents phénotypes de CSP décrits dans la bibliographie sont également classés en fonction de leur agressivité. Les phénotypes positifs à la myosine 11 et à la périostine sont de mauvais pronostic, alors que les CSP exprimant la podoplanine sont classées dans la catégorie de bon pronostic **[Neuzillet et al. 2018]**. Par ailleurs, il a été démontré que l'adipophiline, protéine exprimée dans les vésicules lipidiques, est le seul marqueur de quiescence valable utilisable *in situ* concernant les CSP **[Friberg et al. 2017]**. Aussi, dans le cadre d'une analyse *in situ*, il serait intéressant d'étudier le co-marquage de TRPM7 avec les 4 marqueurs précédemment décrits comme suit : TRPM7/adipophiline (marquage des CSP quiescentes), TRPM7/podoplanine (marquage des CSP activées de bon pronostic), TRPM7/myosine 11 ou périostine (marquage des CSP activées agressives).

Dans le cas d'une intensité de marquage pour TRPM7 croissante de la quiescence au mauvais pronostic, nous pourrions confirmer que le niveau d'expression du canalyne augmente avec le niveau d'activation.

L'inclusion des résultats obtenus sur tissus de patient nous permettrait d'une part de confirmer les résultats *in vitro*, et d'autre part, de présenter le canal TRPM7 comme un biomarqueur de l'agressivité des CSP et du stroma tumorale dans l'ACP.

5) Implication du canal TRPM7 dans l'activation des CSP :

Au cours de nos travaux, nous avons démontré que TRPM7 régule positivement la prolifération cellulaire en régulant l'expression de p53 *via* la voie PI3K/Akt (Figure 38 et 39). L'invalidation de TRPM7 engendre une augmentation importante de P53 responsable de l'effet inhibiteur de la prolifération. Le facteur P53 est également connu pour être impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides et inhiber le stockage lipidique cellulaire [Assaily *et al.* 2011].

A l'inverse, il a été démontré, par une étude récente, qu'une augmentation de l'expression de P53 induit une élévation de la formation de vésicules lipidiques stockant le rétinol dans les CSP [Saison-Ridinger *et al.* 2017]. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de P53 favorise le retour des CSP à la quiescence.

L'activation des CSP est caractérisée, outre par l'expression de α -SMA, par la perte de leur rôle de stock lipidique et par l'acquisition d'un phénotype hautement prolifératif. L'impact négatif de TRPM7 sur l'expression de P53 suggère que celui-ci puisse favoriser l'activation des CSP. Son rôle sur le métabolisme lipidique et l'expression des gouttelettes lipidiques reste à démontrer. Il est possible de vérifier cette hypothèse en microscopie à immunofluorescence *via* un marquage au Nile red dans des conditions variables d'expression de TRPM7. De plus, nous avons démontré que le siTRPM7 induit une variation de l'expression de la desmine et de la vimentine (Figure 51) dont l'expression est également modulée avec l'induction de la quiescence par l'ATRA (Figure 46), confirmant l'hypothèse du rôle inhibiteur de TRPM7 sur la quiescence.

Par ailleurs, le récepteur PPAR- γ est connu pour favoriser la quiescence des CSP, puisque son activation par des agonistes empêche l'activation de ces dernières [McCarroll *et al.* 2006]. Il a été démontré que TRPM7 régule la différenciation adipogénique sur modèle de préadipocyte. En effet, l'utilisation de shTRPM7 diminue significativement le stockage lipidique, l'activité GPDH (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase), ainsi que l'expression de PPAR- γ et l'activation d'Akt [Che *et al.*

2014]. Ces travaux démontrent que TRPM7 est un régulateur potentiel du métabolisme lipidique ainsi que de l'expression de PPAR- γ .

Enfin, nos résultats démontrent qu'il y a une corrélation entre le niveau d'expression de TRPM7 et le niveau d'activation des cellules PS-1 *in vitro*.

L'ensemble de ces données suggère que le canal TRPM7 puisse être un régulateur de l'activation des CSP en inhibant l'expression de PPAR- γ ainsi que le stockage lipidique *via* P53. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'expression des vésicules lipidiques en immunofluorescence *via* un marquage au Nile Red sur cellules transfectées ou non avec le siTRPM7, traitées au NS8593, ainsi qu'à la Nutline 3a. Une quantification de l'expression de PPAR- γ par Western-Blot en fonction des conditions listées précédemment devra être réalisée. De plus, l'utilisation d'agoniste de PPAR- γ en culture suivi d'une quantification de l'expression de TRPM7, α -SMA, des vésicules lipidiques, de P53 ainsi que des acteurs signalétiques impliqués, permettrait de confirmer le lien entre activation et expression de TRPM7. PPAR- γ est également connu pour former des hétérotétramères avec le récepteur du rétinol (RR), et nos résultats montrent que l'ATRA inhibe l'expression du canal TRPM7. Le traitement combiné des cellules avec des agonistes de PPAR- γ et avec l'ATRA permettrait également d'investiguer le rôle des hétérodimères PPAR- γ /Récepteur au rétinol sur la quiescence/activation des PS-1. Enfin, l'utilisation de siTRPM7 et NS8593 sur cellules traitées aux agonistes de PPAR- γ et à l'ATRA achèvera de démontrer le rôle de TRPM7 dans l'activation des CSP.

Ces manipulations complémentaires permettraient de déterminer le rôle du canal TRPM7 dans l'acquisition du phénotype activé par les CSP, mais également de caractériser son rôle exact dans le processus d'activation des CSP.

6) Rôle du canal TRPM7 dans la communication MET/tumeur :

Nos résultats montrent que les cellules PS-1 répondent au milieu conditionné de cellules d'ACP par une élévation du niveau d'expression du canal TRPM7 permettant une augmentation de la prolifération et de l'activation des cellules PS-1 (Figure 48).

Au cours de ce travail, nous nous sommes concentrés sur le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération et l'activation des CSP. Le canal TRPM7 est également exprimé dans les cellules d'ACP et est impliqué dans les mécanismes de migration et d'invasion cellulaire [Rybarczyk *et al.* 2012 et 2017].

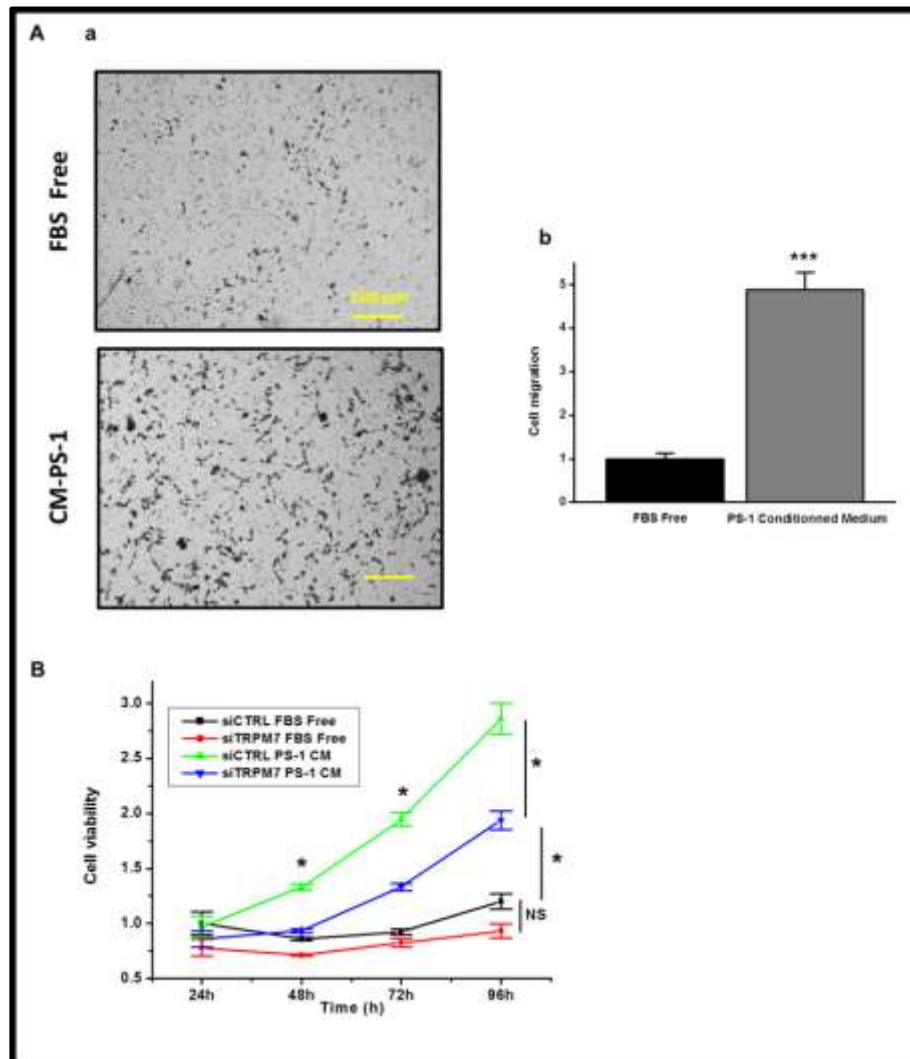


Figure 60) Rôle du canal TRPM7 dans la prolifération et la migration des cellules d'ACP induite par les CSP :

Images représentant les cellules MIA Paca-2 migrantes suite au traitement ou non avec le MC de cellule PS-1 (A-a). Quantification de la migration des cellules MIA Paca-2 dans les mêmes conditions (A-b). Cinétique de viabilité des cellules MIA Paca-2 en fonction du traitement au MC de PS-1 et du siRNA utilisé (B). Expériences réalisées à t=48h de traitement ; N=3 ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

L'interaction entre les CSP et les cellules d'ACP par le biais de facteurs solubles favorise l'acquisition et le développement de capacités prolifératives, migratoires et invasives par les CSP comme par les cellules d'ACP [Apte et al. 2002].

Afin d'intégrer le canal TRPM7 au compartiment tumoral et d'investiguer son rôle dans la communication des CSP vers les cellules d'ACP, nous avons testé la prolifération et la migration des cellules MIA Paca-2 en réponse au MC de cellules PS-1 (Figure 60). Nos résultats montrent que les MC de cellules PS-1 favorisent la prolifération et la migration des cellules d'ACP MIA Paca-2. Le canal TRPM7 est impliqué dans la prolifération cellulaire induite par les MC de PS-1 alors qu'il n'est pas impliqué dans la prolifération cellulaire basale dans ce modèle cellulaire (Figure 60-B). Ces résultats préliminaires suggèrent que le canal TRPM7 influence la communication cellulaire entre les cellules d'ACP et les CSP. Néanmoins, il est nécessaire de confirmer l'effet prolifératif dépendant de TRPM7 par une analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux dans les mêmes conditions (siCTRL, siTRPM7 et cultivées ou non en MC de cellules PS-1). L'expression et l'activité du canal TRPM7 sur les cellules cultivées dans le MC de CSP devra également être quantifiée en western blot et patch-clamp. Les cellules d'ACP traitées avec le MC de CSP devront également être analysées en imagerie cationique de façon à déterminer l'espèce ionique impliquée dans la prolifération dépendante du canal TRPM7.

La validation de cette hypothèse de travail basée sur nos résultats préliminaires démontrerait l'influence du canal TRPM7 sur la communication tumeur/MET. Le chanzyme TRPM7 constituerait alors une cible thérapeutique majeure de la communication intercellulaire et de l'activation du MET dans l'ACP.

RESULTATS et DISCUSSION :

Partie II

Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines dans les cellules d'ACP :

Partie II) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines dans les cellules d'ACP :

Les récentes avancées scientifiques en cancérologie expérimentale ont permis de mettre en évidence l'impact du microenvironnement (ou stroma tumoral) dans le développement, la survie et l'agressivité de la tumeur. L'ACP est, par ailleurs, caractérisé par la mise en place d'un stroma tumoral inflammatoire qui favorise l'agressivité du cancer [Xu *et al.* 2014]. Ce phénomène, appelé réaction desmoplastique, est le théâtre d'un important remodelage de la matrice extracellulaire accompagnée de la synthèse de matrikines [Maquart *et al.* 1999]. Ces matrikines (oligopeptides d'origine matricielle) sont connues pour favoriser le développement du cancer et la formation des métastases [Pupa *et al.* 2002 ; Maquart *et al.* 2004]. L'élastine constitue la principale fibre matricielle responsable de l'élasticité des tissus. Il a été démontré que la MEC associée au cancer est particulièrement riche en élastine, et constitue un véritable réservoir de peptide d'élastine. Les peptides d'élastine sont impliqués dans la migration, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse, la survie cellulaire ou encore l'adhésion dans de nombreux modèles cellulaires tels que les fibroblastes, les CMLV, les cellules endothéliales ou encore les cellules cancéreuses [Duca *et al.* 2004 ; Scandolera *et al.* 2016].

Parallèlement, de nombreuses études tendent à impliquer les canaux ioniques à différents stades de développement du cancer. Le canal TRPM7 est par ailleurs proposé comme un acteur important dans l'ACP. En effet, son niveau d'expression est proportionnel à l'agressivité de la tumeur et inversement proportionnel à la survie des patients. Le canal TRPM7 est par ailleurs connu pour être impliqué dans la migration et l'invasion des cellules d'ACP [Rybarczyk *et al.* 2012 ; Rybarczyk *et al.* 2017].

Nous avons démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans l'interaction entre les cellules d'ACP et la composante cellulaire stromale représentée par les CSP. Nous souhaitons étudier le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération et la migration dépendante des peptides d'élastines. Le but de ce travail est d'étudier le rôle du canal TRPM7 dans la migration et la prolifération des cellules d'ACP en réponse aux

peptides d'élastine. Au cours de ce travail nous avons étudié le rôle du canal TRPM7 sur la migration des cellules cancéreuses d'ACP induite par les peptides dérivés de l'élastine AG-9 et VG-6.

RESULTATS :

1) Effet des peptides d'élastine sur la migration et la prolifération des cellules MIA Paca-2 :

Afin de valider les effets des peptides d'élastines sur la migration et la prolifération des cellules MIA Paca-2 nous avons testé plusieurs concentrations (Figure 61-A).

Les tests de migration en insert de Boyden ont permis de déterminer la concentration efficace minimale en peptide d'élastine AG-9. Les Images représentent les cellules ayant traversée la face inférieure de l'insert. Un nombre important de cellules migrantes est visible dans la condition traitée avec 10^{-7} M soit 0,1 μ M de peptide d'élastine AG-9 en comparaison avec le contrôle non traité (Figure 61-A-a). Les concentrations inférieures en AG-9 ne parviennent pas à induire d'effet sur la migration en comparaison à la condition contrôle. On constate une augmentation similaire de la migration cellulaire en condition traitée avec 10^{-7} M d'AG-9 ($173,6 \pm 11\%$) en comparaison au contrôle NT ($100 \pm 7,5\%$) (Figure 61-A-b). Aucune augmentation significative de la migration cellulaire n'est observée pour des concentrations en peptide AG-9 de 10^{-9} M ($103,4 \pm 8,3\%$), et 10^{-8} M ($108,4 \pm 8,2\%$) comparé au contrôle (Figure 61-A). La figure représente la prolifération cellulaire en fonction de la concentration en peptide d'élastine AG-9 (Figure 61-A-c). Les concentrations de 10^{-9} M ($104 \pm 3,7\%$), 10^{-8} M ($100 \pm 1,8\%$) et 10^{-7} M ($101,3 \pm 1,1\%$) ne parviennent pas à augmenter la prolifération cellulaire par rapport au contrôle ($100 \pm 1,9\%$). Les capacités migratoires des cellules MIA PaCa-2 ont également été testées avec le peptide VG-6 (Figure 61-B).

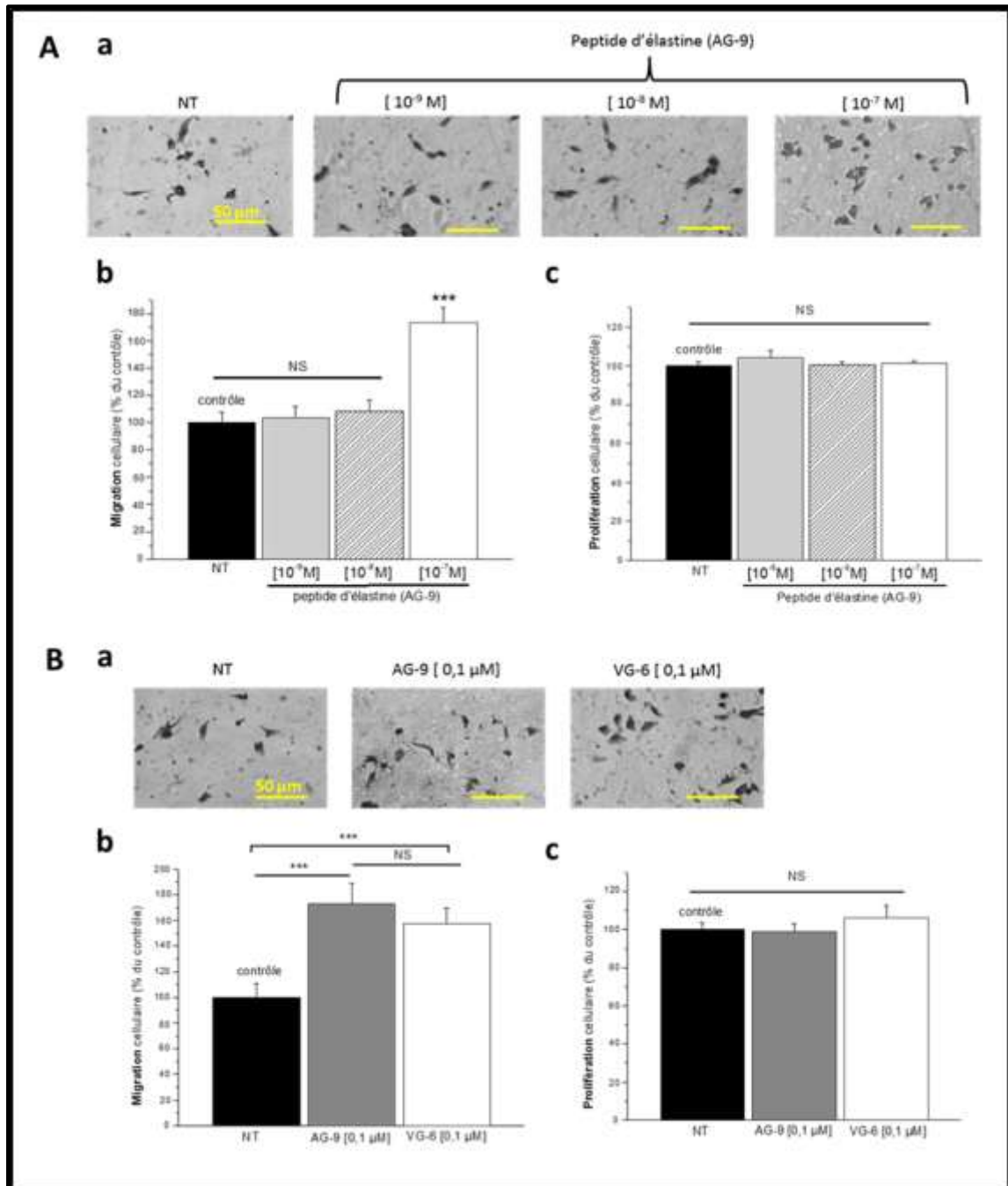


Figure 61) Effet des peptides d'élastines sur la migration et la viabilité des cellules MIA Paca-2 :

Effet des peptides d'élastine AG-9 et VG-6 sur la prolifération et la migration des cellules MIA Paca-2. Clichés présentant le nombre de cellules ayant traversé la membrane des inserts en fonction de la concentration en AG-9 (A-a). Quantification de la migration des cellules MIA PaCa-2 en fonction des concentrations de peptide AG-9 utilisées ; N=3 (A-b). Quantification de la prolifération cellulaire des MIA PaCa-2 par test au MTT en fonction de la concentration en AG-9 ; N=3 (A-c). Images d'inserts de Boyden montrant les cellules migrantes en fonction du type de peptide utilisé (B-a). Quantification de la migration cellulaire en fonction des peptides AG-9 et VG-6 ; N=3 (B-b). Quantification de la prolifération des cellules MIA PaCa-2 en fonction du type de peptide ; N=3 (B-c). NS p>0.05 *** p<0,001).

Sur les images présentant les cellules ayant migré, on constate une augmentation du nombre de ces cellules lorsqu'elles sont traitées avec 0,1 μ M d'AG-9 et avec 0,1 μ M de VG-6 en comparaison avec le contrôle non traité. La quantification de ces résultats présente une augmentation similaire de la migration des cellules traitées avec 0,1 μ M de peptide AG-9 ($180 \pm 10,6\%$) et VG-6 ($201,7 \pm 17,9\%$) comparé au contrôle ($100 \pm 8,9\%$) (Figure 61-B). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les conditions AG-9 et VG-6. Les cellules MIA PaCa-2 ne prolifèrent pas d'avantage lorsqu'elles sont en contact avec 0,1 μ M d'AG-9 ($98,9 \pm 4,2\%$) ou de VG-6 ($106,4 \pm 6,1\%$) comparé au contrôle ($100 \pm 3,6\%$).

2) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines :

La lignée PANC-1, connue pour exprimer le canal TRPM7, a servi de contrôle positif [Rybarczyk *et al.* 2012], l'eau a été utilisée comme contrôle négatif (Figure 62-A). Le canal TRPM7 est identifié par son poids moléculaire proche de 273 paires de bases (pb). Le canal TRPM6 est également exprimé dans la lignée MIA PaCa-2 contrairement à la lignée PANC-1. L'extinction de l'expression du canal TRPM7 48h post transfection a été quantifiée par RT-qPCR (Figure 62-B). L'expression relative du canal TRPM7 est rapportée à l'expression de la β -actine servant de gène de référence. Une diminution importante de l'expression du canal TRPM7 est observée pour les cellules transfectées avec un siTRPM7 ($9,72 \pm 1,21\%$) en comparaison avec la condition contrôle siCTRL (fixé à 100%) (Figure 62-B).

Afin de vérifier que le canal TRPM7 est bien impliqué dans la migration cellulaire induite par l'AG-9, son expression a été inhibée par le siTRPM7. Les images d'inserts de Boyden montrent une augmentation du nombre de cellules migrantes après traitement avec 0,1 μ M d'AG-9 comparé au contrôle (Figure 62-C-a).

L'utilisation du siTRPM7 engendre une diminution importante de la migration cellulaire des cellules traitées avec l'AG-9 ainsi que des cellules non traitées (Figure 62-C-a).

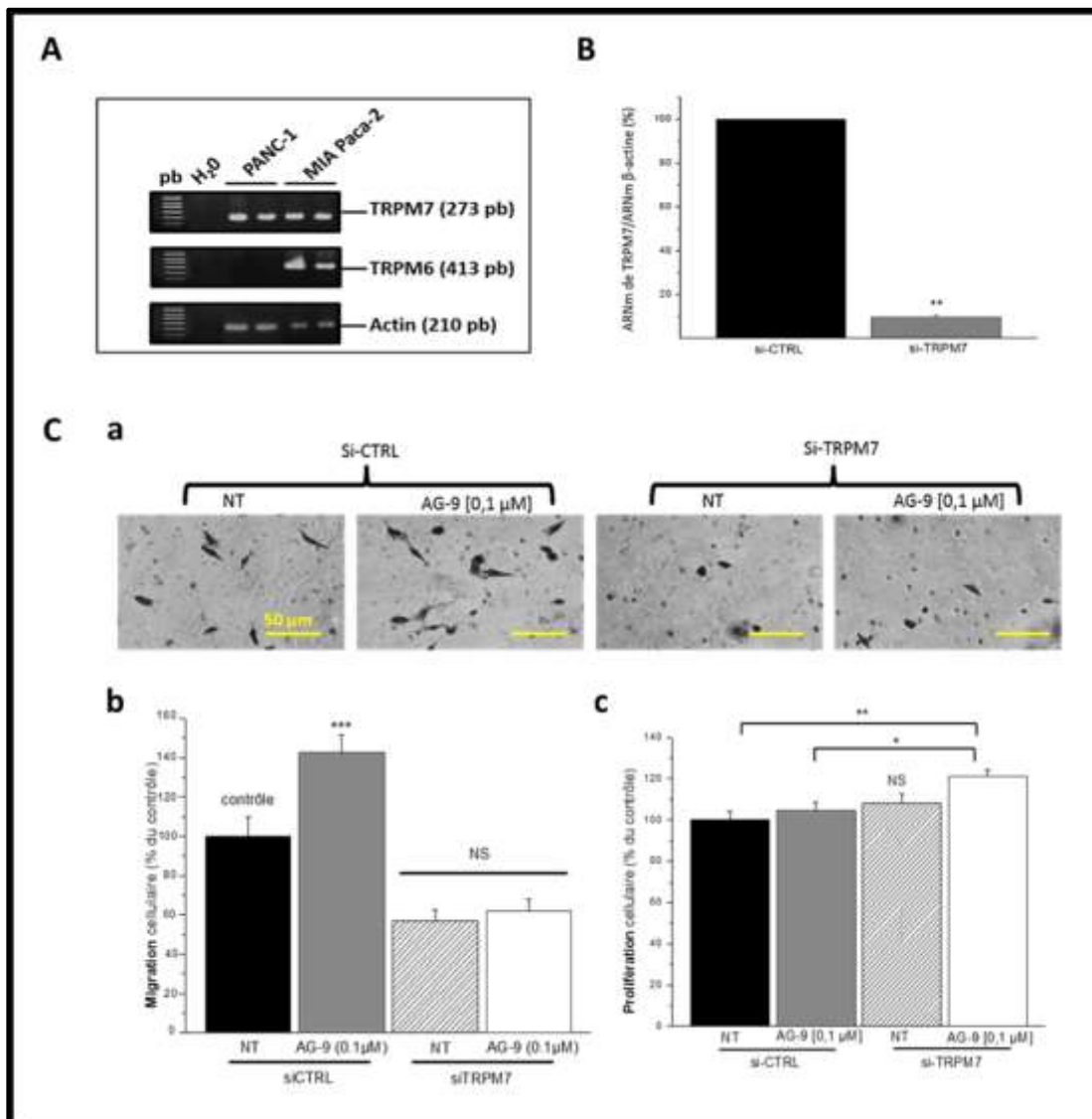


Figure 62) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par les peptides d'élastines sur les cellules MIA PaCa-2 :

Expression du canal TRPM7 sur la lignée MIA PaCa-2. Expression qualitative du canal TRPM7 par RT-PCR sur les lignées d'ACP PANC-1 et MIA PaCa-2 ; N=2 (A). Quantification de l'expression du canal TRPM7 en fonction du type de siRNA (siCTRL ou siTRPM7) par qRT-PCR ; N=3 (B). Images des cellules migrantes sur insert de Boyden en fonction du peptide AG-9 et du type de siRNA utilisé (C-a). Quantification de la migration des cellules MIA PaCa-2 en fonction du peptide AG-9 et du type de siRNA employé ; N=3 (C-b). Quantification de la prolifération cellulaire en fonction du traitement avec l'AG-9 et du siRNA transfecté ; N=3 (C-c). NS $p > 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La quantification des résultats de migration couplés à l'utilisation de siRNA contre TRPM7 montre une augmentation de la migration cellulaire en réponse à l'AG-9 ($142,7 \pm 8,8\%$) comparé au contrôle ($100 \pm 9,8\%$) (Figure 62-C-b). Une diminution importante de la migration par rapport au contrôle est visible pour les conditions siTRPM7, que les cellules soient traitées avec $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 ($61,9 \pm 6\%$) ou non ($56,9 \pm 5,4\%$). Ces deux conditions ne sont pas significatives entre elles (Figure 62-C-b). Enfin, les tests de prolifération sur 24h réalisés sur cellules transfectées montrent une augmentation légère de la prolifération cellulaire pour les cellules traitées avec $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 et transfectées avec le siTRPM7 ($121,3 \pm 3\%$) comparées au contrôle ($100 \pm 4,7\%$) (Figure 62-C-c). Aucune variation significative de la prolifération cellulaire n'est visible pour les cellules traitées avec $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 et transfectées avec le siCTRL ($104,7 \pm 4,6\%$) et les cellules non traitées transfectées avec siTRPM7 ($108,2 \pm 4,3\%$) par rapport au contrôle (Figure 62-C-c).

3) Effet des peptides d'élastine sur l'expression du canal TRPM7 et l'entrée cationique :

Une quantification de l'expression de TRPM7 dans les cellules MIA PaCa-2 suite à une période d'incubation de 24 et 48h dans un milieu contenant $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 a été effectuée par la méthode de RT-qPCR (Figure 63-A). Aucune différence statistiquement significative n'apparaît entre les différentes conditions. Une augmentation non significative de l'expression de TRPM7 est néanmoins visible 48h après traitement avec $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 ($154,4 \pm 37,5 \%$) (Figure 63-A). Afin de visualiser les effets d'une incubation de 24h dans un milieu concentré à $0,1 \mu\text{M}$ d'AG-9 sur la fonctionnalité du canal TRPM7 dans les cellules MIA PaCa-2 des tests d'imagerie calciques ont été réalisés (Figure 63-B).

Les tracés d'imagerie ne semblent pas présenter de variation du niveau de fluorescence entre la condition traitée à l'élastine et la condition non traitée. La quantification de ces résultats ne montre aucune différence significative entre la condition AG-9 ($-1,37 \pm 0,11$) et le contrôle NT ($-1,40 \pm 0,11$) (Figure 63-B).

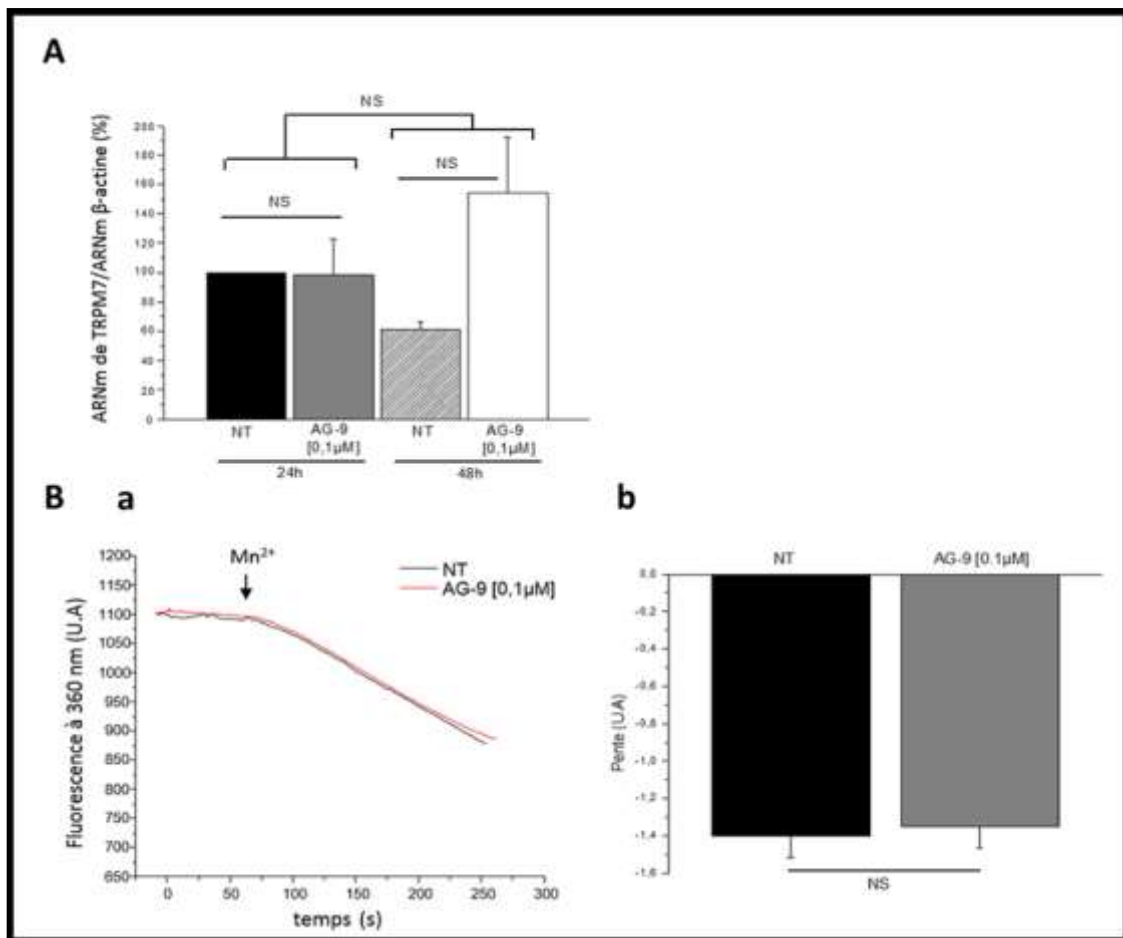


Figure 63) Effet des peptides d'élastines sur l'expression du canal TRPM7 et l'entrée cationique dans les cellules MIA Paca-2 :

Impact du peptide d'élastine AG-9 sur l'expression transcriptionnelle et fonctionnelle de TRPM7 dans les MIA PaCa-2. Quantification par qRT-PCR de l'expression de TRPM7 24 et 48h après ajout de l'AG-9 dans le milieu N=2 (A). Tracés d'imagerie représentant l'extinction au Mn^{2+} de la fluorescence en fonctions de l'AG-9 (B). Quantification des pentes d'extinction du tracés B ; N=2 (C). NS P>0,05.

4) Effet des peptides d'élastine sur l'activité du canal TRPM7 et l'homéostasie calcique :

Les tests d'imagerie calcique avec perfusion du peptide AG-9 et mesure de l'effet induit en temps réel ont été effectués afin de vérifier l'effet de l'AG-9 sur le calcium intracellulaire (Figure 64-A). Sur les tracés moyens présentés dans la figure une augmentation du ratio de fluorescence de la sonde calcique en réponse à la perfusion de 0,1 μM d'AG-9 est observée, de même qu'une diminution du ratio pour un milieu de perfusion sans Ca^{2+} (Figure 64-A-a). Les résultats sont également présentés sous forme d'histogrammes représentant chacun une condition de perfusion. L'analyse de ces résultats indique une augmentation importante du ratio de fluorescence 15 minutes après perfusion du peptide AG-9 dans le milieu ($1,41 \pm 2,95 \cdot 10^{-4}$) en comparaison avec le ratio basal contrôle ($1,27 \pm 3,01 \cdot 10^{-4}$) (Figure 64-A-b).

Afin de vérifier l'implication du canal TRPM7 dans ce processus, les mêmes tests ont été réalisés sur cellules transfectées (Figure 64-B). Une diminution de la réponse à l'AG-9 est visible en condition siTRPM7 comparé à la condition contrôle siCTRL sur le tracé présenté en figure (Figure 64-B-a). La quantification indique une diminution significative du ratio entre les conditions siTRPM7 basale ($1,19 \pm 2,78 \cdot 10^{-4}$) et siCTRL basale ($1,22 \pm 3,79 \cdot 10^{-4}$), mais également entre les conditions siTRPM7 ($1,28 \pm 9,01 \cdot 10^{-4}$) et siCTRL ($1,31 \pm 6,29 \cdot 10^{-4}$) après perfusion de l'AG-9 (Figure 64-B-b). Dans un second temps les courants TRPM7 ont été enregistrés par la technique de Patch-Clamp dans les cellules MIA Paca-2 (Figure 64-C).

La courbe présentant l'évolution du courant enregistré en fonction du temps permet de visualiser la genèse d'un courant sortant après 9 minutes d'enregistrement en condition siCTRL pour des valeurs de potentiels de +100 mV (Figure 64-C). Ce courant est diminué lorsque les cellules sont transfectées avec le siTRPM7. Aucune variation d'intensité des courants entrants enregistrés à -100 mV n'est observée entre la condition siTRPM7 et le contrôle siCTRL (Figure 64-C).

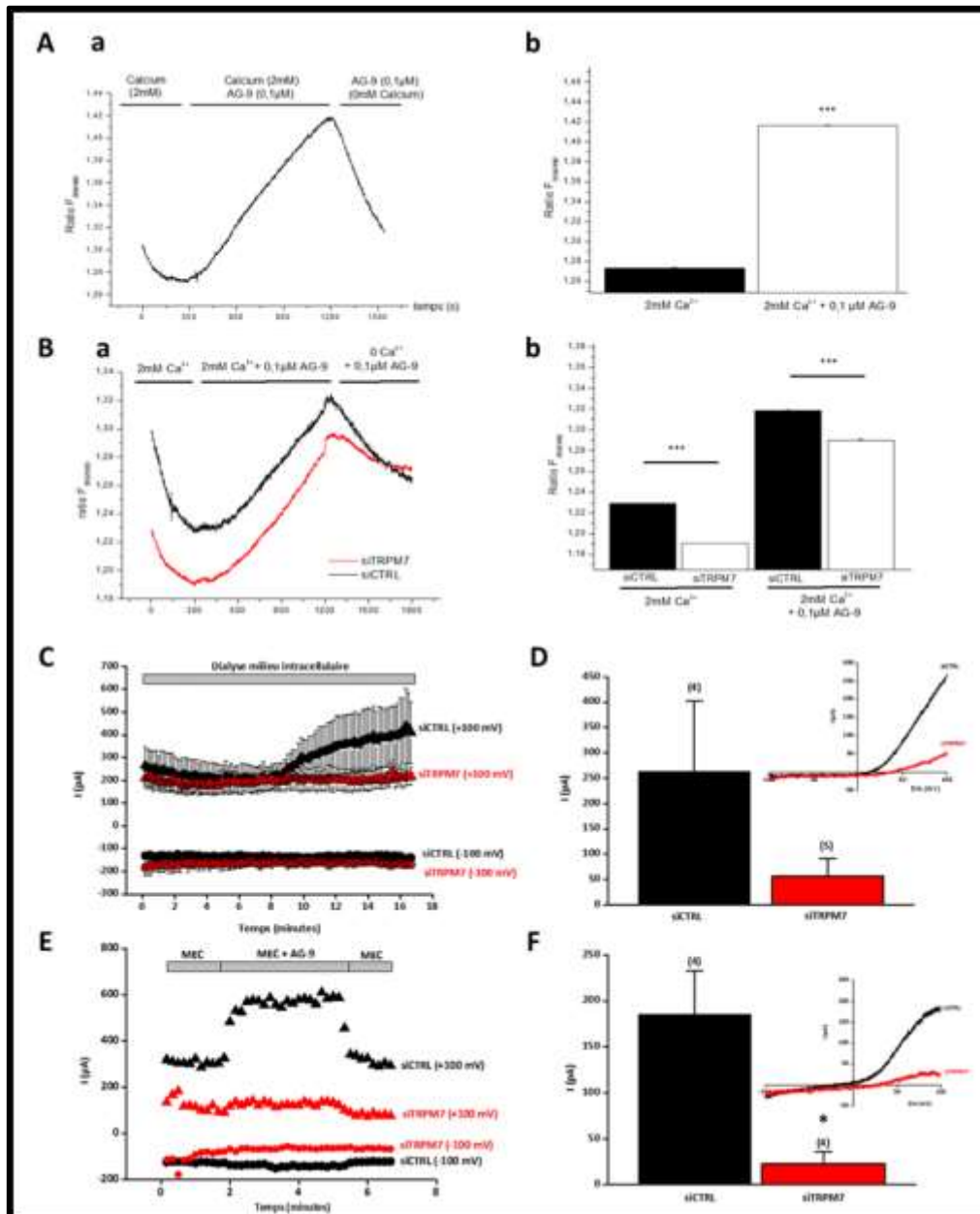


Figure 64) Effet des peptides d'élastines sur l'homéostasie calcique et l'activité du canal TRPM7 :

Effet du peptide AG-9 sur l'entrée de Ca²⁺ induite par l'AG-9 dans les cellules MIA PaCa-2. Courbe représentant les variations du ratio de fluorescence du Fura-2 en fonction du milieu perfusé ; N=3 (A-a). Quantification du tracé présentés en A pour chaque condition (A-b). Effet du siTRPM7 sur la variation de ratio induite par l'AG-9 ; N=3 (B-a). Quantification des tracés présentés en B (B-b). Effet du peptide AG-9 sur le courant typique de TRPM7 dans les MIA PaCa-2. Développement des courants entrant (-100 mV) et sortant (+100 mV) en fonction du temps pour les différentes conditions (C). Quantification des courant contrôle et siTRPM7 enregistrés (D). Enregistrement des courants mis en place en réponse à l'AG-9 en fonction du siRNA transfecté (E). Quantification du courant induit par l'AG-9 sur cellules siCTRL et siTRPM7 (F). NS P>0,05 ; * p<0,05 *** p<0,001

Une quantification de l'intensité des courants obtenus après applications de la rampe de potentiels est réalisée (Figure 64-D). La diminution de l'intensité du courant en condition siTRPM7 (56 ± 35 pA) comparée au courant contrôle siCTRL n'est pas significative (262 ± 140) (Figure 64-D).

Le peptide d'élastine AG-9 a ensuite été perfusé dans le milieu de Patch-Clamp. Les enregistrements montrent une augmentation de l'intensité du courant sortant enregistré à +100 mV en réponse à l'AG-9, cette augmentation n'est pas observée lorsque les cellules sont transfectées avec le siTRPM7 (Figure 64-E). De la même façon, un léger courant entrant mesuré à -100 mV semble se développer suite à la perfusion du peptide AG-9 en condition siCTRL, ce courant ne semble pas apparaître en condition siTRPM7 (Figure 64-E). La figure de quantification indique une diminution significative du courant en réponse à l'AG-9 en condition siTRPM7 (23 ± 13 pA) comparé à la condition contrôle siCTRL (185 ± 48 pA) (Figure 64-F).

DISCUSSION :

Les principaux résultats mis en évidence au cours de ce travail sont : 1) les peptides d'élastine augmentent la migration des cellules d'ACP ; 2) le canal TRPM7 est impliqué dans la migration induite par les peptides d'élastine ; et 3) les peptides d'élastine augmentent l'entrée calcique ainsi que le courant TRPM7 dans les cellules d'ACP.

Le canal TRPM7 est exprimé dans la lignée MIA PaCa-2, tout comme dans d'autres lignées d'ACP, les cellules BxPC-3 et PANC-1 [Rybarczyk *et al.* 2012]. Parmi toutes les concentrations testées expérimentalement en migration, le peptide d'élastine AG-9 a un effet pro-migratoire à une concentration de 0,1 μ M. Lorsque les peptides d'élastine sont appliqués en concentrations supérieures (> 1 μ M), ils n'ont pas d'effets biologiques (Figure 61). Cette absence d'effet serait due à l'agrégation des peptides entre eux [Moscarelli *et al.* 2014 ; DaSilva *et al.* 2018]. La fenêtre d'efficacité du peptide AG-9 sur la migration des MIA PaCa-2 est donc relativement restreinte puisqu'elle est comprise entre des concentrations supérieures à 100 nM et inférieures à 1 μ M. C'est pourquoi, la concentration utilisée lors de l'ensemble des

expériences est de 0,1 μM d'AG-9 (Figure 61). Toutefois, la concentration des peptides d'élastine *in vivo* lors du remodelage pathologique de la MEC n'est pas connue. Nous ne savons donc pas pour le moment si la concentration utilisée *in vitro* est physiologique.

Les peptides d'élastines sont connus pour leurs activités chimiotactiques sur de nombreux types cellulaires [Senior *et al.* 1980 ; Blood *et al.* 1988]. Dans nos expériences de migration cellulaire, l'AG-9 est appliquée à la même concentration dans les compartiments supérieur et inférieur de l'insert. De plus, nous n'appliquons pas de chémoattractant dans le compartiment inférieur (SVF ou BSA). Par conséquent, nous pouvons estimer que l'AG-9 augmente la migration basale des cellules MIA PaCa-2. A l'inverse, aucun effet sur la prolifération des cellules MIA PaCa-2 n'est observé pour les concentrations d'AG-9 testées (Figure 61). Les peptides d'élastines sont néanmoins connus pour stimuler la prolifération cellulaire à des concentrations supérieures à 0,1 μM [Mochisuki *et al.* 2002]. Les tests de proliférations réalisés en parallèle des tests de migration montrent que l'augmentation de la migration cellulaire n'est pas liée à une éventuelle augmentation de la prolifération cellulaire induite par le peptide.

Les tests de migrations supplémentaires réalisés avec le peptide VG-6 confirment que les peptides d'élastine augmentent la migration des cellules MIA PaCa-2. Toutefois, nous n'avons pas testé d'autres concentrations pour le peptide VG-6 (Figure 61). Il serait donc intéressant, comme pour l'AG-9, de tester les effets de plusieurs concentrations de peptide VG-6 sur la migration et la prolifération des cellules MIA PaCa-2.

Afin de vérifier si les effets des peptides d'élastine observés sur la migration étaient liés au canal TRPM7, celui-ci a été inhibé par un siRNA spécifique (Figure 62). En effet, le canal TRPM7 est connu pour être un acteur important de la migration dans le modèle du cancer du sein [Guilbert *et al.* 2013], ainsi que sur la lignée d'ACP BxPc-3 [Rybarczyk *et al.* 2012]. L'inhibition de l'expression du canal TRPM7 médiée par ARN interférents a été confirmée par qRT-PCR. En effet, 48h après transfection des siRNA, une diminution de plus de 90% de l'expression des transcrits de TRPM7 est observable (Figure 62). Cette technique a permis de confirmer l'efficacité de la technique de transfection ainsi que du siTRPM7 utilisé. L'utilisation de siRNA contre TRPM7 montre une diminution importante de la migration cellulaire des cellules MIA

PaCa-2. L'incubation des cellules avec le peptide d'élastine à 0,1 μM ne parvient plus à augmenter la migration cellulaire lorsque le canal TRPM7 est inhibé (Figure 62). Alors que les peptides d'élastine induisent l'augmentation de la migration d'environ 70% pour les cellules transfectées à l'aide d'un siRNA non-codant (siCTRL) Ainsi la diminution de la migration induite par l'AG-9 est bien la conséquence de l'inhibition de TRPM7 et non de la transfection cellulaire. Afin de confirmer ces résultats, il serait également possible de bloquer le canal TRPM7 à l'aide d'un agent pharmacologique tel que le NS8593 ou encore la waixenicine A.

Une analyse par qRT-PCR a été effectuée afin de vérifier si l'incubation des cellules MIA PaCa-2 en présence des peptides d'élastine (24 et 48h) entraînait une variation de l'expression du canal TRPM7. Il apparaît que l'incubation des cellules pendant 24h dans un milieu contenant 0,1 μM d'AG-9 n'a aucun effet significatif sur l'expression du canal TRPM7 (Figure 63). Néanmoins une incubation de 48h entraîne l'augmentation de l'expression du canal TRPM7. Cependant, cette augmentation d'expression n'est pas statistiquement significative et il faut donc augmenter le nombre d'expériences afin de conclure sur un effet éventuel effet des peptides d'élastine sur l'expression des canaux TRPM7 (Figure 63). De plus, la migration cellulaire est testée après 24 h d'incubation en présence des peptides d'élastine et nous n'observons pas de variation de l'expression de TRPM7 pour ce temps d'incubation (Figure 63). Par conséquent, l'effet pro-migratoire de l'AG-9 sur les cellules MIA PaCa-2 ne peut être expliqué par une augmentation de l'expression des canaux TRPM7.

Pour confirmer ce résultat, nous avons utilisé le protocole d'extinction de la fluorescence calcique par le Mn^{2+} afin d'enregistrer l'entrée cationique (Figure 63-B).

En effet, le canal TRPM7 est connu pour réguler l'entrée cationique constitutive dans les cellules MIA Paca-2 [Rybarczyk *et al.* 2012 et 2017]. Les cellules incubées 24h avec 0,1 μM d'AG-9 présentent un profil de réponse similaire aux cellules non-traitées. Ainsi l'entrée cationique basale n'est pas modifiée par l'incubation des cellules MIA PaCa-2 en présence de l'AG-9 (Figure 63-B).

Nous avons ensuite utilisé les techniques de Patch-Clamp et d'imagerie calcique afin de tester les effets de l'AG-9 appliqué de façon aiguë sur les flux calciques et les courants TRPM7 (Figure 64).

En effet, il a été démontré que la Kappa élastine induit un influx calcique dans les fibroblastes, les CMLV et les cellules endothéliales [Fulop *et al.* 1986 ; Jacob *et al.* 1987]. De plus l'influx calcique induit par les peptides d'élastine favorise la migration amoïboïde des cellules cancéreuses *via* la calpaïne [Brassart *et al.* 2019].

Les résultats montrent une hausse significative de la concentration calcique intracellulaire suite à la perfusion des cellules avec un milieu contenant 2 mM de Ca^{2+} et 0,1 μM d'AG-9 (Figure 64-A). Une diminution significative de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est observée suite à la perfusion d'un milieu dépourvu de Ca^{2+} mais contenant 0,1 μM d'AG-9 (Figure 64-A). Ainsi, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induite par la perfusion d'AG-9 est bien la conséquence d'une entrée du Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire. Le Ca^{2+} étant un second messenger impliqué dans la migration cellulaire, il est possible que l'effet pro migratoire exercé par l'AG-9 sur les cellules MIA PaCa-2 soit directement lié à cette augmentation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire.

Afin de vérifier qu'il s'agit bien d'une entrée calcique dépendante du canal TRPM7, les mêmes tests ont été réalisés sur cellules transfectées (Figure 64-B). Les résultats montrent que le niveau de fluorescence calcique basal varie en fonction des conditions, suggérant que le canal TRPM7 est impliqué dans l'homéostasie calcique constitutive. Cependant, l'inactivation de TRPM7 n'inhibe pas l'influx calcique induit par les peptides d'élastine. Ces résultats montrent que l'influx calcique induit par l'AG-9 dans les cellules MIA Paca-2 est indépendant du canal TRPM7 (Figure 64-B).

Ces résultats suggèrent également que la migration cellulaire induite par les peptides d'élastines dans les cellules MIA Paca-2 est calcium indépendante.

L'analyse électrophysiologique par Patch-Clamp a permis de confirmer ces résultats en montrant, d'une part que le canal TRPM7 est fonctionnel dans les cellules MIA PaCa-2 en permettant la genèse d'un courant cationique inhibé par le siTRPM7 (Figure 64-C). Toutefois, l'inhibition du courant MIC par le siTRPM7 n'est pas statistiquement significative principalement à cause du faible nombre de cellules testées en siCTRL et de leur grande variabilité. Ces résultats préliminaires doivent donc être confirmés en augmentant le nombre de cellules dans la condition siCTRL (Figure 64-D). D'autre part, les cellules MIA PaCa-2 développent un courant de type cationique non-sélectif en réponse à l'AG-9 (Figure 64-E). Ce courant activé par

l'AG-9 ne présente pas tout à fait le même profil qu'un courant de type TRPM7, notamment au niveau de la rectification sortante. Ce profil atypique suggère que le courant sensible à l'AG-9 pourrait être la résultante de l'activation de plusieurs types de canaux ioniques. Toutefois, la perfusion d'AG-9 n'active plus de courant sur des cellules MIA PaCa-2 traitées avec le siTRPM7 (Figure 64-E). Ces résultats sont très intéressants et suggèrent que l'AG-9 active le canal TRPM7 qui, à son tour, pourrait interagir avec d'autres canaux. Cette hypothèse nécessite bien sûr d'être testée à l'aide d'autres expériences, en utilisant par exemple des bloqueurs d'autres canaux sur le courant sensible à l'AG-9. Il est intéressant de noter que les peptides dérivés de l'élastine sont connus pour interagir avec des canaux calciques activés par le voltage et induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire aboutissant à une réorganisation du cytosquelette [Jones *et al.* 1980]. Néanmoins, le peptide d'élastine AG-9 ne semble pas favoriser la migration des cellules d'ACP MIA PaCa-2 par une entrée calcique transitoire, puisque celle-ci ne dépend pas du canal TRPM7.

Il est possible que l'AG-9 exerce une activation directe sur le canal TRPM7, ou indirecte par le biais du récepteur aux peptides d'élastine. Bien que l'existence d'un complexe de récepteurs aux peptides d'élastine ait été mise en évidence, les voies de signalisation qu'il déclenche demeurent peu connues [Blood *et al.* 1988].

Le peptide d'élastine AG-9 pourrait également induire la stimulation de deux récepteurs différents (ERC et RPSA) de façon simultanée. Les récepteurs ERC et RPSA pourrait alors stimuler des processus différents ce qui expliquerait la dissociation entre l'influx calcique indépendant de TRPM7 et la migration cellulaire dépendante de TRPM7. Néanmoins, il est également possible qu'un même récepteur active la migration *via* TRPM7 ainsi que l'influx calcique en parallèle. De même qu'il est possible que les peptides d'élastine modulent directement l'activité de canaux ioniques.

Les précédents travaux du laboratoire montrent que migration cellulaire basale des cellules MIA Paca-2 est un processus dépendant du magnésium [Rybarczyk *et al.* 2012]. Dans la mesure où nous montrons que l'influx calcique induit par les peptides d'élastines est indépendant du canal TRPM7 (Figure 64-B) et que les peptides d'élastine activent le courant MIC (Figure 64-E), il est probable que le magnésium soit impliqué dans la migration cellulaire dépendante de TRPM7 en réponse aux

peptides d'élastines. Aussi, il est important de mesurer le ratio de fluorescence magnésique (MagFura-2) dans les cellules traitées ou non avec l'AG-9 couplé à la transfection du siTRPM7 afin de vérifier cette hypothèse. De plus, nous pourrions tester le processus de migration cellulaire induit par l'AG-9 en fonction de la transfection en condition de supplémentation magnésique.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Partie II

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Au cours de ces travaux nous démontrons que 1) les peptides d'élastines AG-9 et VG-6 régulent la migration des cellules MIA Paca-2. 2) le canalyon TRPM7 est indispensable à la migration cellulaire induite par les peptides d'élastines. 3) les peptides d'élastines activent un courant dépendant du canal TRPM7 ainsi qu'un influx calcique ne dépendant pas de TRPM7 (Figure 65).

Il serait néanmoins intéressant de réaliser des tests d'imagerie calcique et de Patch Clamp avec le peptide VG-6 et la K-élastine afin de généraliser ce mode d'action à d'autres peptides d'élastine.

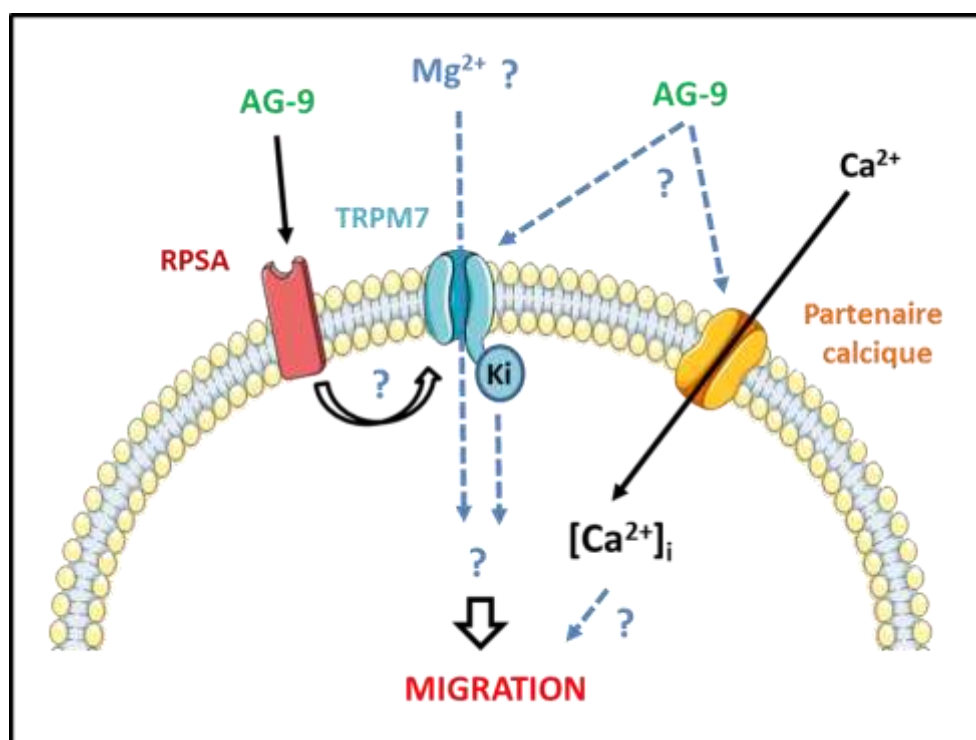


Figure 65) Rôle du canal TRPM7 dans la migration induite par le peptide AG-9 dans les cellules MIA Paca-2 :

Les peptides d'élastine AG-9 favorisent la migration dépendante du canal TRPM7 dans les cellules MIA Paca-2. Les hypothèses et sur le mode d'action de l'AG-9, le mécanisme de TRPM7 impliqué ou encore le rôle de l'influx calcique dans la migration cellulaire sont représentés en pointillés.

Les perspectives de ce travail sont d'étudier si les peptides d'élastine exercent un effet direct sur le canal TRPM7 ou indirect *via* l'activation du récepteur aux peptides d'élastine RPSA. Ainsi il sera nécessaire de vérifier par co-immunoprécipitation et microscopie confocale la colocalisation entre ces deux protéines dans la membrane plasmique. D'un point de vue fonctionnel, il est nécessaire de tester l'effet d'un siRNA dirigé contre le récepteur aux peptides d'élastine RPSA sur l'entrée calcique transitoire et le courant ionique activés par l'AG-9 **[Brassart et al. 2018]**. Le récepteur RPSA n'étant pas l'unique récepteur des peptides d'élastines, il est également important de vérifier l'implication éventuelle de l'ERC (Elastin Receptor Complex) dans les mécanismes décrits.

D'autre part, et comme nous l'avons évoqué précédemment, le magnésium est un régulateur de la migration cellulaire constitutive dans les cellules MIA Paca-2 **[Rybarczyk et al. 2012]**. Nous devrions investiguer le rôle du magnésium dans la migration cellulaire induite par le peptide AG-9 *via* la technique expérimentale de supplémentation magnésique.

Le canal TRPM7 est également connu pour favoriser la migration cellulaire *via* son domaine kinase. Nous devrions caractériser le mode d'action du canal TRPM7 en traitant les cellules avec des inhibiteurs de la fonction kinase du chanzyme (rottlerin, TG100-115), dans des conditions expérimentales similaires (traitement avec AG-9).

Il s'agira également de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans la migration cellulaire induite par les peptides d'élastines et dépendante du canal TRPM7. Pour cela nous devrions investiguer les voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire et la régulation des éléments du cytosquelette.

Il a été démontré que les peptides d'élastines (K-élastine et VGVAPG) régulent l'invasion et la migration des cellules de fibrosarcomes HT-1080 en augmentant l'expression de la pro-MMP2, de uPa et de Hsp90 **[Donet et al. 2014]**. Les résultats récents du laboratoire montrent que le canal TRPM7 régule l'invasion constitutive des cellules MIA Paca-2 en favorisant l'expression des mêmes acteurs **[Rybarczyk et al. 2017]**. Nous devrions également étendre notre étude au processus invasif induit par les peptides d'élastine afin de confirmer que le canal TRPM7 régule l'invasion en activant la même voie.

D'autre part, il serait intéressant de comprendre l'apport de l'influx calcique induit par les peptides d'élastines sur la migration cellulaire. En effet, nous avons démontré que le canal TRPM7 n'est pas impliqué dans l'influx calcique induit par l'AG-9 (Figure 64-B) mais influence la migration cellulaire (Figure 62). Nos résultats suggèrent que l'influx calcique puisse être dissocié du processus migratoire. Néanmoins nous devrions confirmer cette hypothèse en analysant la migration cellulaire induite par l'AG-9 dans un milieu sans calcium en employant le chélateur calcique EGTA.

En effet, les peptides d'élastines sont connus pour induire un influx calcique dans les cellules traitées [Fulop *et al.* 1986 ; Jacob *et al.* 1987]. Cette entrée de calcium est impliquée dans le processus de migration amiboïde [Brassart *et al.* 2018].

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois l'effet d'un composant du stroma cancéreux (les matrikines) sur l'activité du canal TRPM7 et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques humaines.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION et PERSPECTIVES GENERALES :

Au cours de ce travail, nous avons démontré le rôle du canal TRPM7 dans l'interaction entre la tumeur et son stroma dans l'ACP. Nos résultats montrent que le canalyonme TRPM7 influence à la fois la communication entre le compartiment matriciel et la cellule cancéreuse mais également entre la cellule tumorale et les CSP. Nous avons démontré que : 1) le canal TRPM7 influence la prolifération des CSP induite par les sécrétions de cellules cancéreuses, l'expression du canal TRPM7 dans les CSP augmente également lorsqu'elles sont traitées avec le CM de cellules d'ACP ; 2) Le canalyonme TRPM7 régule la prolifération des cellules d'ACP induite par le MC de CSP, alors qu'il ne régule pas la prolifération basale sur ce modèle ; 3) Le canal TRPM7 régule également la migration des cellules d'ACP induite par les peptides dérivés de l'élastine.

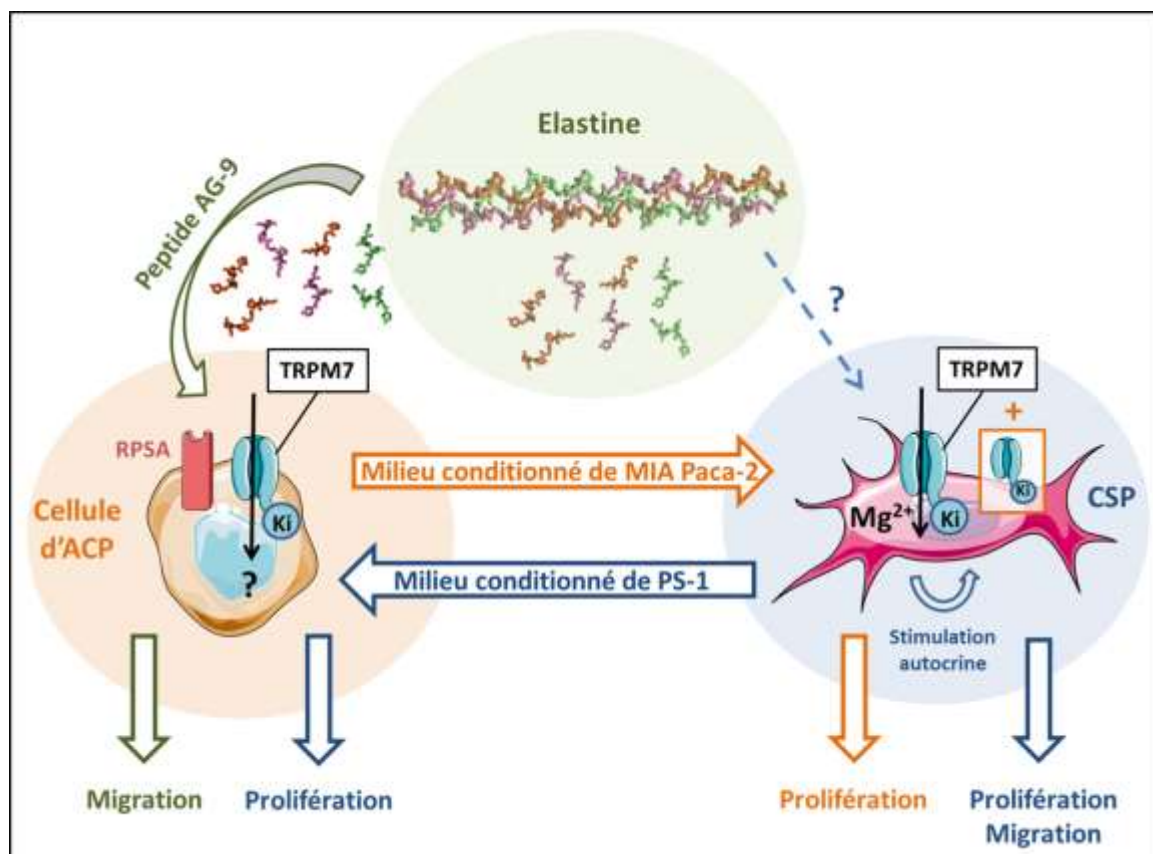


Figure 66) Rôle du canal TRPM7 dans l'interaction Tumeur / MET :

Le compartiment tumoral est représenté en orange, le compartiment stromal acellulaire en vert et la composante cellulaire du MET en bleu.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que le canal TRPM7 est exprimé et fonctionnel dans les cellules tumorales mais également dans les cellules du MET majoritairement représentées par les CSP. Nous montrons également que le canal est impliqué dans l'échange entre la tumeur et son environnement (Figure 66).

Les mécanismes impliquant le canal TRPM7 dans la prolifération des CSP induite par le milieu conditionné de cellule d'ACP ont été mis en évidence et détaillés au cours de ce travail (Figure 48). Malgré cela, le rôle du canal TRPM7 dans la prolifération et la migration des cellules d'ACP induites par les sécrétions de CSP demeure mal connu (Figure 60). Nos résultats montrent que le canal TRPM7 est nécessaire à la croissance cellulaire induite par le milieu conditionné de CSP mais ne permettent pas de déterminer les mécanismes impliqués (Figure 60). L'étude du rôle exact du canal TRPM7 dans ce processus (conductance, cibles et voies de signalisation) devrait être étudié, et l'effet prolifératif confirmé en cytométrie de flux. Enfin, afin de confirmer les résultats que nous avons obtenus en utilisant des milieux conditionnés, nous pourrions intégrer à notre étude des expérimentations de co-culture de CSP et cellules d'ACP qui constitueraient un modèle de communication bidirectionnelle, considéré plus proche des conditions physiopathologiques.

Néanmoins, au cours de ces travaux nous avons principalement étudié la communication entre CSP et cellules d'ACP (Résultats partie 1), ainsi que la communication entre la MEC et les cellules d'ACP (Résultats partie 2), mais aucun de nos travaux ne porte sur l'interaction entre les CSP et les composants de la MEC.

Il serait intéressant d'investiguer le rôle du canal TRPM7 dans la communication entre la composante cellulaire et acellulaire du MET, en nous intéressant principalement à l'effet des peptides dérivés de l'élastine sur la prolifération et la migration des CSP. En effet, nous avons démontré que le canalyne TRPM7 est impliqué dans la prolifération et la migration basale des CSP. De plus, les peptides dérivés de l'élastine favorisent la migration dépendante du canal TRPM7 dans les cellules d'ACP et sont connus pour influencer la prolifération cellulaire dans les fibroblastes [Shiratsushi *et al.* 2010]. Nous devrions alors évaluer les effets du peptide d'élastine AG-9 sur la prolifération des cellules PS-1 et RLT-PSC *via* des tests de viabilité cellulaire et de cytométrie de flux, en utilisant le siTRPM7 et le

NS8593. L'expression des récepteurs RPSA et de l'ERC ainsi que leur éventuelle co-localisation avec le canal TRPM7 devront être validées en Western blot.

D'autre part, le rôle des peptides d'élastine sur la synthèse d'élastine par les CSP n'a jamais été étudié. Or, il a été démontré que les peptides d'élastine stimulent la prolifération cellulaire mais inhibent la synthèse d'élastine par les CMLV [Wachi et al. 1995]. Les activateurs de la prolifération cellulaire tels que l'EGF ou l'angiotensine-II exercent un effet inhibiteur sur la synthèse d'élastine suggérant que la production d'élastine et la prolifération cellulaire sont deux processus antagonistes [Tokimitsu et al. 1990 et 1994]. Enfin, il a été démontré que la synthèse maximale d'élastine est générée par les cellules situées en phase G0 du cycle cellulaire alors que les cellules situées en phase G2/M en synthétisent très peu [Tajima et al. 1996].

De plus, nos résultats montrent que le canal TRPM7 favorise la prolifération des CSP (Figure 38) mais inhibe la synthèse d' α -SMA (Figure 51) associée au phénotype myofibroblastique sécrétoire de composants de la MEC. En effet, l'expression de α -SMA par les CSP est associée à la sécrétion de MEC (notamment de collagène de type I) et correspond au phénotype myofibroblastique.

Aussi, il est possible que les peptides d'élastines renforcent la prolifération TRPM7-dépendante et inhibent la synthèse d'élastine par les CSP. Dans un premier temps, nous devrions confirmer que l'inhibition de la synthèse de α -SMA par le canal TRPM7 est bien associée à une diminution de la synthèse de composants de la MEC et principalement d'élastine. Ces résultats nous permettraient de confirmer que le canal TRPM7 inhibe le processus sécrétoire au profit de la prolifération cellulaire dans les CSP. Nous devrions ensuite étudier le rôle des peptides d'élastine sur la migration dépendante de TRPM7 et sur la synthèse d'élastine dans les CSP. Ces résultats nous permettraient de montrer que les peptides d'élastine favorisent la prolifération ainsi que l'activation des CSP *via* le canal TRPM7.

L'obtention de résultats confirmant l'influence du canal TRPM7 sur la communication entre les éléments cellulaires et acellulaires du MET achèverait d'impliquer le canal TRPM7 dans l'activation du stroma tumoral. Dans cette configuration, le canal TRPM7 pourrait être considéré comme une cible thérapeutique de premier plan dans l'activation du MET. Cibler le canalyon TRPM7 permettrait de réduire, d'une part,

l'apport de la MEC et des matrikines sur la prolifération et la migration des cellules d'ACP et des CSP, et d'autre part, l'influence de la communication réciproque de ces deux types cellulaires sur l'activation du MET, la progression cancéreuse et la génération de métastases.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):863-77. PMID:14697204
- Abed, E., & Moreau, R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell proliferation*, 40(6), 849-865.(2007).
- Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, Manova-Todorova K, Leversha M, Hogg N, Seshan VE, Norton L, Brogi E, Massague J. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*. 2011;150:165-78.
- Adrain, C., E. M. Creagh & S. J. Martin (2001). "Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2." *The EMBO Journal* 20(23): 6627-6636.
- Ahern, M., P. Hall, and J. Halliday. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology*. 1996 23:193.
- Alderton A, Davies P, Illman K, Brown DR. Ancient conserved domain protein-1 binds copper and modifies its retention in cells. *J Neurochem* 103: 312-321, 2007.
- Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P . (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 7: 831-836.
- Ali A, Hoefflich KP, Woodgett JR (2001). "Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation". *Chemical Reviews*. 101 (8): 2527-40. doi:10.1021/cr000110o. PMID 11749387
- Allam A, Thomsen AR, Gothwal M, Saha D, Maurer J, Brunner TB, Pancreatic stellate cells in pancreatic cancer: In focus..*Pancreatology*. 2017 Jul - Aug;17(4):514-522. doi: 10.1016/j.pan.2017.05.390. Epub 2017 May 27. Review. PMID: 28601475
- Altura BM, Kostellow AB, Zhang A, Li W, Morrill GA, Gupta RK, Altura BT. Expression of the nuclear factor-kappaB and proto-oncogenes c-fos and c-jun are induced by low extracellular Mg²⁺ in aortic and cerebral vascular smooth muscle cells: possible links to hypertension, atherogenesis, and stroke. *Am J Hypertens*2003; 16: 701-7.
- Amato, R., L. D'Antona, G. Porciatti, V. Agosti, M. Menniti, C. Rinaldo, N. Costa, E. Bellacchio, S. Mattarocci, G. Fuiano, S. Soddu, M. G. Paggi, F. Lang & N. Perrotti (2009). "Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation." *Journal of Molecular Medicine* 87(12): 1221-1239.
- Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Oncol/ Hematol* 42: 79-91, 2002.
- Andoh, A., H. Takaya, T. Saotome, M. Shimada, K. Hata, Y. Araki, F. Nakamura, Y. Shintani, Y. Fujiyama, and T. Bamba.. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *2000 Gastroenterology*. 119:211-219.
- Angela Y. Wehr, Emma E. Furth, Vineet Sangar, Ian A. Blair, and Kenneth H. Yu Analysis of the Human Pancreatic Stellate Cell Secreted Proteome *Pancreas*. 2011 May; 40(4): 557-566. doi: 10.1097/MPA. PMID: 21499210
- Antonicevich F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W. Elastin-elasticases and inflamm-aging. *Curr Top Dev Biol*. 2007; 79():99-155.
- Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Ishijima T, Satoh Y, Hanatsuka K, et al. Autocrine loop between TGF-beta1 and IL-1beta through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006a;290:C1100-8.

- Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Shinozaki S, Kita H, Osawa H, et al. Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C259–68.
- Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Shinozaki S, Kita H, Yamamoto H, et al. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem.* 2006b;99:221–8.
- Apte, M.V., P.A. Phillips, R.G. Fahmy, S.J. Darby, S.C. Rodgers, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R.C. Pirola, D. Naidoo, and J.S. Wilson. 2000. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology.* 118:780-794.
- Apte, M.V., P.S. Haber, S.J. Darby, S.C. Rodgers, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R.C. Pirola, and J.S. Wilson. 1999. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines : implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut.* 44:534-541.
- Apte, M.V., P.S. Haber, T.L. Applegate, I.D. Norton, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R.C. Pirola, and J.S. Wilson.. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. 1998 *Gut.* 43:128-133.
- Apte, M.V., R.C. Pirola, and J.S. Wilson. 2012. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol.* 3:344.
- Apte, M.V., S. Park, P.A. Phillips, N. Santucci, D. Goldstein, R.K. Kumar, G.A. Ramm, M. Buchler, H. Friess, J.A. McCarroll, G. Keogh, N. Merrett, R. Pirola, and J.S. Wilson. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. 2004. *Pancreas.* 29:179-187.
- Arcangeli, A., O. Crociani, and L. Bencini. Interaction of tumour cells with their microenvironment: ion channels and cell adhesion molecules. A focus on pancreatic cancer. 2014. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 369:20130101
- Armstrong, T., G. Packham, L.B. Murphy, A.C. Bateman, J.A. Conti, D.R. Fine, C.D. Johnson, R.C. Benyon, and J.P. Iredale.. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. 2004 *Clin Cancer Res.* 10:7427-7437.
- Arrieta O, Gonzalez-De la Rosa CH, Arechaga-Ocampo E, Villanueva- Rodriguez G, Ceron-Lizarraga TL, et al. (2010) Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28: 3463–3471.
- Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G972–8.
- Ashrafizadeh M1, Mohammadinejad R, Tavakol S, Ahmadi Z, Roomiani S, Katebi M. Autophagy, anoikis, ferroptosis, necroptosis, and endoplasmic reticulum stress: Potential applications in melanoma therapy. *J Cell Physiol.* 2019 Nov;234(11):19471-19479. doi: 10.1002/jcp.28740. Epub 2019 Apr 29.
- Atilla-Gokcumen GE, Castoreno AB, Sasse S, Eggert US. Making the cut: the chemical biology of cytokinesis. *ACS Chemical Biology* 2010;5(1):79–90.
- Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 2014;4:62–70.
- Bachem, M.G., E. Schneider, H. Gross, H. Weidenbach, R.M. Schmid, A. Menke, M. Siech, H. Beger, A. Grunert, and G. Adler. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. 1998 *Gastroenterology.* 115:421-432.

- Bachem, M.G., M. Schunemann, M. Ramadani, M. Siech, H. Beger, A. Buck, S. Zhou, A. Schmid-Kotsas, and G. Adler.. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. 2005 *Gastroenterology*. 128:907-921.
- Bachem, M.G., S. Zhou, K. Buck, W. Schneiderhan, and M. Siech.. Pancreatic stellate cells--role in pancreas cancer 2008. *Langenbecks Arch Surg*. 393:891-900.
- Bachem, M.G., Z. Zhou, S. Zhou, and M. Siech.. Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. 2006 *J Gastroenterol Hepatol*. 21 Suppl 3:S92-96.
- Bailey, J.M., B.J. Swanson, T. Hamada, J.P. Eggers, P.K. Singh, T. Caffery, M.M. Ouellette, and M.A. Hollingsworth.. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. 2008 *Clin Cancer Res*. 14:5995-6004.
- Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28: 304–305, 2000.
- Baldoli E, Maier JA (2012) Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 15:47–57. doi: 10.1007/s10456-011-9242-0 PMID: 22183257
- Ban C, Junop M, Yang W. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97: 85–97, 1999.
- Barry-Hamilton, R. Spangler, D.Marshall, S. McCauley, H.M. Rodriguez, M. Oyasu,A. Mikels, M. Vaysberg, H. Ghermazien, C. Wai, C.A. Garcia, A.C. Velayo, B. Jorgensen, D. Biermann, D. Tsai, J. Green, S. Zaffryar-Eilot, A. Holzer, S. Ogg, D. Thai, G. Neufeld, P. Van Vlasselaer, V. Smith, Allosteric inhibition of lysyl oxidaselike- 2 impedes the development of a pathologic microenvironment, *Nat. Med.* 16 (2010) 1009–1017.
- Barzilay G, Mol CD, Robson CN, Walker LJ, Cunningham RP, Tainer JA, Hickson ID. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nature Struct Biol* 2: 561–568, 1995.
- Baumert JT, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Inhibitory effects of interferons on pancreatic stellate cell activation. *World J Gastroenterol*. 2006;12:896–901.
- Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 28;20(32):11182-98.
- Bénard J Microenvironment and tumor progression: the progress concept. *Bull Cancer*. 2004 Sep;91(9):663-5. French. No abstract available. PMID: 15544991
- Berchtold, S., B. Grunwald, A. Kruger, A. Reithmeier, T. Hahl, T. Cheng, A. Feuchtinger, D. Born, M. Erkan, J. Kleeff, and I. Esposito.. Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. 2015 *Cancer Lett*. 356:721-732.
- Berg T, DeLanghe S, Al Alam D, Utley S, Estrada J, Wang KS *J Surg Res*. 2010 Dec; 164(2):276-85. β -catenin regulates mesenchymal progenitor cell differentiation during hepatogenesis.
- Bernardini D, Nasulewicz A, Mazur A, Maier JAM. Magnesium and microvascular endothelial cells: a role in inflammation and angiogenesis. *Front Biosci* 2005; 10: 1177-82.
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P . (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 13: 1775–1785
- Bessac BF, Fleig AJ *Physiol*. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. 2007 Aug 1;582(Pt 3):1073-86. Epub 2007 May 17. PMID:17510191
- Bi, Y., J. Li, B. Ji, N. Kang, L. Yang, D.A. Simonetto, J.H. Kwon, M. Kamath, S. Cao, and V. Shah. 2014. Sphingosine-1-phosphate mediates a reciprocal signaling pathway between stellate cells and cancer cells that promotes pancreatic cancer growth. *The American journal of pathology*. 184:2791-2802.

- Biegging, K. T. & L. D. Attardi (2012). "Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression." *Trends in Cell Biology* 22(2): 97-106.
- Blood, C.H., et al., Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol*, 1988. 107(5): p. 1987-93.
- Boise, L. H., A. R. Gottschalk, J. Quintáns & C. B. Thompson (1995). *Bcl-2 and Bcl-2-Related Proteins in Apoptosis Regulation*. Apoptosis in Immunology. G. Kroemer and C. Martinez-A. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 107-121.
- Brabek, J., C.T. Mierke, D. Rosel, P. Vesely, and B. Fabry.. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *2010 Cell Commun Signal*. 8:22.
- Brassart B, Da Silva J, Donet M, Seurat E, Hague F, Terryn C, Velard F, Michel J, Ouadid-Ahidouch H, Monboisse JC, Hinek A, Maquart FX, Ramont L, Brassart-Pasco S. Tumour cell blebbing and extracellular vesicle shedding: key role of matrikines and ribosomal protein SA. *Br J Cancer*. 2019 Feb;120(4):453-465. doi: 10.1038/s41416-019-0382-0. Epub 2019 Feb 11.
- Brautigam CA, Steitz TA. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol* 8: 54–63, 1998.
- Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, Cantelmo AR, Franzi F, Capella C, Ferlazzo G, Mortara L, Albini A, Noonan DM. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 2013;15:133–42.
- Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, Ellenrieder V, Schneiderhan W, Siech M, et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med* ; 2005;83:795–805.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:463-518.
- Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2016 Aug 11;18(1):84. doi: 10.1186/s13058-016-0740-2. Review PMID: 27515302
- Cai N, Lou L, Al-Saadi N, Tetteh S, Runnels LW. The kinase activity of the channel-kinase protein TRPM7 regulates stability and localization of the TRPM7 channel in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*. 2018 Jul 20;293(29):11491-11504. doi: 10.1074/jbc.RA118.001925. Epub 2018 Jun 4. PMID: 29866880
- Cai, N.; Bai, Z.; Nanda, V.; Runnels, L.W. Mass Spectrometric Analysis of TRPM6 and TRPM7 Phosphorylation Reveals Regulatory Mechanisms of the Channel-Kinases. *Sci. Rep.* 2017, 7, 42739. PMID: 28220887
- Callera, G.E.; He, Y.; Yogi, A.; Montezano, A.C.; Paravicini, T.; Yao, G.; Touyz, R.M. Regulation of the novel Mg²⁺ transporter transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) cation channel by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *J.Hypertens*. 2009, 27,155–166.
- Calsou P, Salles B. Properties of damage-dependent DNA incision by nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 22: 4937–4942, 1994.
- Cantley, L. C. (2002). "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway." *Science* 296(5573): 1655-1657.
- Cao G, Hoenderop JG, Bindels RJ. Insight into the molecular regulation of the epithelial magnesium channel TRPM6. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 373–378, 2008.
- Cao R, Meng Z, Liu T, Wang G, Qian G, Cao T, Guan X, Dan H, Xiao Y, Wang X. Decreased TRPM7 inhibits activities and induces apoptosis of bladder cancer cells via ERK1/2 pathway. *Oncotarget*. 2016 Nov 8;7(45):72941-72960. doi: 10.18632/oncotarget.12146. PMID: 27662662

- Cao Y, Jiang Z, Zeng Z, Liu Y, Gu Y, Ji Y, Zhao Y, Li Y Bcl-2 silencing attenuates hypoxia-induced apoptosis resistance in pulmonary microvascular endothelial cells. *Apoptosis*. 2016 Jan;21(1):69-84. doi: 10.1007/s10495-015-1184-3.PMID:26456506
- Carbone C, Piro G, Gaianigo N, Ligorio F, Santoro R, Merz V, Simionato F, Zecchetto C, Falco G, Conti G, Kanga PT, Krampera M, Di Nicolantonio F, De Franceschi L, Scarpa A, Tortora G, Melisi D. Adipocytes sustain pancreatic cancer progression through a non-canonical WNT paracrine network inducing ROR2 nuclear shuttling. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar;42(3):334-343. doi: 10.1038/ijo.2017.285. Epub 2017 Nov 20.
- Carloni V, Luong TV, Rombouts K. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: more complicated than ever. *Liver Int*. 2014 Jul;34(6):834-43. doi: 10.1111/liv.12465. Epub 2014 Feb 12. PMID : 24397349
- Carnero A, Paramio J M . The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, *Cancer Mouse Models*. 2014, Published in *Front. Oncol*.
- Caspi R, Altman T, Dreher K, Fulcher CA, Subhraveti P, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Mueller LA, Ong Q, Paley S, Pujar A, Shearer AG, Travers M, Weerasinghe D, Zhang P, Karp PD. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 40: D742–753, 2012.
- Castiglioni S, Cazzaniga A, Trapani V, Cappadone C, Farruggia G, Merolle L, Wolf FI, Iotti S, Maier JAM. Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci Rep*. 2015 Nov 13;5:16538. doi: 10.1038/srep16538. PMID: 26563869
- Castiglioni S, Maier JA. Magnesium and cancer: a dangerous liason. *Magnesium Res* 24: S92–100, 2011
- Cazzaniga, C Moscheni, V Trapani, F I. Wolf, G Farruggia, A Sargenti, S Iotti, J A. M. Maier, S Castiglioni, The different expression of TRPM7 and MagT1 impacts on the proliferation of colon carcinoma cells sensitive or resistant to doxorubicin *Sci Rep*. 2017; 7: 40538. Published online 2017 Jan 17. doi: 10.1038/srep40538
- Chaigne-Delalande B, Li FY, O'Connor GM, Lukacs MJ, Jiang P, Zheng L, Shatzer A, Biancalana M, Pittaluga S, Matthews HF, Jancel TJ, Bleesing JJ, Marsh RA, Kuijpers TW, Nichols KE, Lucas CL, Nagpal S, Mehmet H, Su HC, Cohen JI, Uzel G, Lenardo MJ. Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science* 341: 186–191, 2013.
- Chandra S, Parker DJ, Barth RF, Pannullo SC. Quantitative imaging of magnesium distribution at single-cell resolution in brain tumors and infiltrating tumor cells with secondary ion mass spectrometry (SIMS). *J Neurooncol*. 2016 Mar;127(1):33-41. doi: 10.1007/s11060-015-2022-8. Epub 2015 Dec 24. PMID:26703785
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37–40.
- Chap HJ, Zwaal RF, van Deenen LL. Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane. *Biochim Biophys Acta* 1977 Jun 2;467(2)
- Che Jianbo Yue Hung-Fat Tse Gui-Rong Li. Functional TRPV and TRPM channels in human preadipocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* May 2014, Volume 466, Issue 5, pp 947–959
- Chen HC, Su LT, González-Pagán O, Overton JD, Runnels LW. A key role for Mg(2+) in TRPM7's control of ROS levels during cell stress. *Biochem J*. 2012 Aug 1;445(3):441-8. doi: 10.1042/BJ20120248. PMID:22587440
- Chen IT, Smith ML, O'Connor PM, Fornace AJ (November 1995). "Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA". *Oncogene*. 11 (10): 1931–7. PMID 7478510.
- Chen JP, Wang J, Luan Y, Wang CX, Li WH, Zhang JB, Sha D, Shen R, Cui YG, Zhang Z, Zhang LM, Wang WB. TRPM7 promotes the metastatic process in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*

Lett. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):483-90. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.032. Epub 2014 Oct 7. PMID:25304381

- Chen L, A DeWispelaere, F Dastvan, W R. A. Osborne, C Blechner, S Windhorst, G Daum Smooth Muscle-Alpha Actin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Inhibiting Rac1 Activity. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0155726 May 13, 2016
- Chen L, Zhang W, Zhou QD, Yang HQ, Liang HF, Zhang BX, Long X, Chen XP. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. Cell Biochem Funct. 2012 Oct; 30(7):588-96
- Chen WL, Barszczyk A, Turlova E, Deurloo M, Liu B, Yang BB, Rutka JT, Feng ZP, Sun HS. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. Oncotarget. 2015a Jun 30;6(18):16321-40. PMID:25965832
- Chen WL, Turlova E, Sun CL, Kim JS, Huang S, Zhong X, Guan YY, Wang GL, Rutka JT, Feng ZP, Sun HS. Xyloketal B suppresses glioblastoma cell proliferation and migration in vitro through inhibiting TRPM7-regulated PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. Mar Drugs. 2015b Apr 22;13(4):2505-25. doi: 10.3390/md13042505. PMID:25913706
- Chen X, Numata T, Li M, Mori Y, Orser BA, Jackson MF, et al. The modulation of TRPM7 currents by nafamostat mesilate depends directly upon extracellular concentrations of divalent cations. Mol Brain. 2010 Dec 1;3:38.
- Cheng, H Imanishi, W Liu, A Iwasaki, N Ueki, H Nakamura T Hada, Inhibition of the expression of α -smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, LI90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, NS-398 Biochemical and Biophysical Research Communications 297 (2002) 1128–1134
- Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). J AmSci. 2008;4:7-9.
- Chien MM, Zahradka KE, Newell MK, Freed JH. Fas-induced B cell apoptosis requires an increase in free cytosolic magnesium as an early event. J Biol Chem. 1999;274:7059–66
- Chokshi R, Fruasaha P, Kozak JA. 2-aminoethyl diphenyl borinate (2-APB) inhibits TRPM7 channels through an intracellular acidification mechanism. Channels (Austin). 2012 Sep-Oct;6(5):362-9. doi: 10.4161/chan.21628. Epub 2012 Aug 24.
- Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA. Detailed examination of Mg²⁺ and pH sensitivity of human TRPM7 channels. J Physiol Cell Physiol. 2012 Apr 1;302(7):C1004-11. doi: 10.1152/ajpcell.00422.2011. Epub 2012 Feb 1. PMID:22301056
- Chowdry, D. R., J. J. Dermody, K. K. Jha & H. L. Ozer (1994). "Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway." Molecular and Cellular Biology 14(3): 1997-2003.
- Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. J Cell Biochem. 2007 Jul 1;101(4):887-907. Review. PMID: 17266048
- Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, Konrad M, Gudermann T Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2; 101(9):2894-9.
- Chubanov, V.; Ferioli, S.; Wisnowsky, A.; Simmons, D.G.; Leitzinger, C.; Einer, C.; Jonas, W.; Shymkiv, Y.; Bartsch, H.; Braun, A.; et al. Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. Elife 2016, 5, e20914. PMID: 27991852
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. Am J Cancer Res. 2011;1:482–97.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. Nature. 2003 Dec 4;426(6966):517-24. PMID:14654832

- Clark K, Middelbeek J, van Leeuwen FN, Interplay between TRP channels and the cytoskeleton in health and disease. *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8-9):631-40. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.01.009. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18342984
- Clark, C.E., S.R. Hingorani, R. Mick, C. Combs, D.A. Tuveson, and R.H. Vonderheide.. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *2007 Cancer Res.* 67:9518-9527.
- Clause, T.H. Barker, Extracellularmatrix signaling in morphogenesis and repair, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013) 830–833.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: link to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-81.
- Cosmai, L.; Gallieni, M.; Porta, C. Renal toxicity of anticancer agents targeting HER2 and EGFR. *J. Nephrol.* 2015, 28, 647–657.
- Couvelard, A., D. O'Toole, R. Leek, H. Turley, A. Sauvanet, C. Degott, P. Ruzzniewski, J. Belghiti, A.L. Harris, K. Gatter, and F. Pezzella. 2005. Expression of hypoxia-inducible factors is correlated with the presence of a fibrotic focus and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Histopathology.* 46:668-676.
- Covacci V, Bruzzese N, Sgambato A, Di Francesco A, Russo MA, Wolf FI, Cittadini A. Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of p27kip1 in human leukemic HL-60 cells. *J Cell Biochem* 1998; 70: 313-22.
- Cowan JA. *The Biological Chemistry of Magnesium.* New York: VCH, 1995.
- Cramer L.P., T.J. Mitchison, Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding *Molecular Biology of the Cell*, 8 (1) (1997), pp. 109-119
- Crawley SW, Côté GP. Identification of dimer interactions required for the catalytic activity of the TRPM7 alpha-kinase domain. *Biochem J.* 2009 Apr 28;420(1):115-22. doi: 10.1042/BJ20081405. PMID: 19228120
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942–9.
- Davis, F.M.; Azimi, I.; Faville, R.A.; Peters, A.A.; Jalink, K.; Putney, J.W., Jr.; Goodhill, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 2014, 33, 2307–2316.
- Deason-Towne F, Perraud AL, Schmitz C. Identification of Ser/Thr phosphorylation sites in the C2-domain of phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) using TRPM7-kinase. *Cell Signal.* 2012 Nov;24(11):2070-5. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.015. Epub 2012 Jul 1. PMID: 22759789
- Deason-Towne, F.; Perraud, A.L.; Schmitz, C. The Mg²⁺ transporter MagT1 partially rescues cell growth and Mg²⁺ uptake in cells lacking the channel-kinase TRPM7. *FEBS Lett.* 2011, 585, 2275–2278.
- DeBaaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease *Physiol Rev.* 2015 Jan;95(1):1-46. doi: 10.1152/physrev.00012.2014. PMID:25540137
- Debelle, L. and A.M. Tamburro, Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. 31(2): p. 261-72. PMID:10216959
- Deliot, N. and B. Constantin, Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1848(10 Pt B): p.2512-22.
- Demeuse P, Penner R, Fleig A. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *J Gen Physiol.* 2006 Apr;127 (4):421-34. Epub 2006 Mar 13. PMID:16533898

- DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Hwang ES, Jirstrom K, West BL, Coussens LM. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011;1:54–67.
- Desai BN, Krapivinsky G, Navarro B, Krapivinsky L, Carter BC, Febvay S, Delling M, Penumaka A, Ramsey IS, Manasian Y, Clapham DE. *Dev Cell.* Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis. 2012 Jun 12;22(6):1149-62. doi: 10.1016/j.devcel.2012.04.006. PMID: 22698280
- Devkota, C.D. Tavares, M. Warthaka, O. Abramczyk, K.D. Marshall, T.S. Kaoud, K. Gorgulu, B. Ozpolat, K.N. Dalby, Investigating the kinetic mechanism of inhibition of elongation factor 2 kinase by NH125: evidence of a common in vitro artifact, *Biochemistry* 51 (2012) 2100–2112. PMID: 22352903
- Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* 2008;27:6245–51.
- Dhennin-Duthille I, Gautier M, Faouzi M, Guilbert A, Brevet M, Vaudry D, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28(5):813-22. doi: 10.1159/000335795. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22178934
- Dibaba .D, Pengcheng Xun, Kuninobu Yokota, Emily White, Ka He Magnesium intake and incidence of pancreatic cancer: the VITamins and Lifestyle study *Br J Cancer.* 2015 Dec 1; 113(11): 1615–1621. Published online 2015 Nov 10. doi: 10.1038/bjc.2015.382. PMID: 2605892
- Ding Z, Maubach G, Masamune A, Zhuo L. Glial fibrillary acidic protein promoter targets pancreatic stellate cells. *Dig Liver Dis.* 2009;41:229–36.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011;71:2455–65.
- Donato, A. L., Huang, Q., Liu, X., Li, F., Zimmerman, M. A., & Li, C.-Y. (2014). Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), 1686– 1692.
- Donehower, L. A. (1996). "The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies." *Seminars in Cancer Biology* 7(5): 269-278.
- Dorovkov MV, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):50643-6. Epub 2004 Oct 12. PMID: 15485879
- Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49(3):235-44. Review
- Dutta, A., J. M. Ruppert, J. C. Aster & E. Winchester (1993). "Inhibition of DNA replication factor RPA by p53." *Nature* 365(6441): 79-82.
- Dyson N.. The regulation of E2F by pRB-family proteins. 1998 *Genes Dev*
- Ebel H, Gunther T. Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 18: 257–270, 1980.
- Eguchi, D., N. Ikenaga, K. Ohuchida, S. Kozono, L. Cui, K. Fujiwara, M. Fujino, T. Ohtsuka, K. Mizumoto, and M. Tanaka. Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. 2013 *The Journal of surgical research.* 181:225-233.
- El-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, K. G. Wiman, W. E. Mercer, M. B. Kastan, K. W. Kohn, S. J. Elledge, K. W. Kinzler & B. Vogelstein (1994). "WAF1/CIP1 Is Induced in p53- mediated G1 Arrest and Apoptosis." *Cancer Research* 54(5): 1169-1174.

- Ellenrieder *et al.* 2000] Ellenrieder, V., B. Alber, U. Lacher, S.F. Hendler, A. Menke, W. Boeck, M. Wagner, M. Wilda, H. Friess, M. Buchler, G. Adler, and T.M. Gress.. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *International journal of cancer*. 2000 *Journal international du cancer*. 85:14-20.
- Ene-Obong A, Clear AJ, Watt J, Wang J, Fatah R, Riches JC, Marshall JF, Chin-Aleong J, Chelala C, Gribben JG, Ramsay AG, Kocher HM Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013 Nov;145(5):1121-32. doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.025. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23891972
- Engelman, J. A., J. Luo & L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." *Nat Rev Genet* 7(8): 606-619.
- Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar;27 Suppl 2:127-34. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07013.x. Review. Erratum in: *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 May;27(5):990. Edderkoui, Mouad [corrected to Edderkaoui, Mouad]. PMID: 22320930
- Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell*. 2010;17:135–47.
- Erkan M, Kleeff J, Gorbachevski A, Reiser C, Mitkus T, Esposito I, et al. Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology*. 2007;132:1447–64.
- Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C.W. Michalski, B. Kong, I. Esposito, H. Friess, and J. Kleeff. 2012. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Current molecular medicine*. 12:288-303.
- Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C.W. Michalski, S. Deucker, D. Sauliunaite, S. Streit, I. Esposito, H. Friess, and J. Kleeff. Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. 2009 *Neoplasia*. 11:497-508.
- Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang P, Coulos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*. 2011;475:226–30.
- Fackler, O. T. & Grosse, R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181, 879–884 (2008).
- Fakih, M.; Vincent, M. Adverse events associated with anti-EGFR therapies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Curr. Oncol.* 2010, 17 (Suppl. 1), S18–S30.
- Fang L, Huang C, Meng X, Wu B, Ma T, Liu X, Zhu Q, Zhan S, Li J. TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Oct 15;280(2):335-44. doi: 10.1016/j.taap.2014.08.006. Epub 2014 Aug 19.
- Fang L, Zhan S, Huang C, Cheng X, Lv X, Si H, Li J. TRPM7 channel regulates PDGF-BB-induced proliferation of hepatic stellate cells via PI3K and ERK pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Nov 1;272(3):713-25. doi: 10.1016/j.taap.2013.08.009. Epub 2013 Aug 16
- Farran B, Nagaraju GP. The dynamic interactions between the stroma, pancreatic stellate cells and pancreatic tumor development: Novel therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Aug;48:11-23. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.07.001. Epub 2019 Jul 17. Review. PMID : 31331827

- Farrow, B., D. Rowley, T. Dang, and D.H. Berger. 2009. Characterization of tumor-derived pancreatic stellate cells. *The Journal of surgical research*. 157:96-102.
- Feig, C., A. Gopinathan, A. Neesse, D.S. Chan, N. Cook, and D.A. Tuveson.. The pancreas cancer microenvironment. 2012 *Clin Cancer Res*. 18:4266-4276.
- Fels B, Nielsen N, Schwab A. Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells. *Eur Biophys J*. 2016 Oct;45(7):657-670. Epub 2016 Sep 26. Erratum in: *Eur Biophys J*. 2016 Oct 27;:PMID: 27670661
- Feng, Z., L. Liu, C. Zhang, T. Zheng, J. Wang, M. Lin, Y. Zhao, X. Wang, A. J. Levine & W. Hu (2012). "Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(18): 7013-7018.
- Ferri, K. F. & G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." *Nat Cell Biol* 3(11): E255-E263.
- FI, Maier JA, Nasulewicz A, Feillet-Coudray C, Simonacci M, Mazur A, Cittadini A. Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458: 24-32.
- Flores-Rozas H, et al. (1994). "Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (18): 8655–8659. doi:10.1073/pnas.91.18.8655. PMC 44665. PMID 7915843
- Folsom AR, Hong CP. Magnesium intake and reduced risk of colon cancer in a prospective study of women. *Am J Epidemiol* 163: 232–235, 2006.
- Fortunato, F., Burgers, H., Bergmann, F., Rieger, P., Buchler, M.W., Kroemer, G., et al. (2009). Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* 137, 350–360. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.003
- Fox J L, MacFarlane M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'. *Br J Cancer*. 2016 Jun 28; 115(1): 5–11. Published online 2016 May 3. doi: 10.1038/bjc.2016.111 PMID: PMC4931361
- Frame, S., Cohen, P. and Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* 7, 1321-1327.
- Freedman, A. D., L. Wu & J. A. Levine (2014). "Functions of the MDM2 oncoprotein." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55(1): 96-107.
- Friedl, P., and K. Wolf. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. 2009a *J Cell Biol*. 188:11-19.
- Fujimura M, Usuki F. Low concentrations of methylmercury inhibit neural progenitor cell proliferation associated with up-regulation of glycogen synthase kinase 3 β and subsequent degradation of cyclin E in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Oct 1;288(1):19-25. doi: 10.1016/j.taap.2015.07.006. Epub 2015 Jul 13.
- Fujita, H., K. Ohuchida, K. Mizumoto, T. Egami, K. Miyoshi, T. Moriyama, L. Cui, J. Yu, M. Zhao, T. Manabe, and M. Tanaka.. Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells. 2009 *Cancer science*. 100:2309- 2317.
- Fukui D, Miyagawa S, Soeda J, Tanaka K, Urayama H, Kawasaki S. Overexpression of transforming growth factor β 1 in smooth muscle cells of human abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25(6):540-5. PMID: 12787696
- Fukushima N, Kikuchi Y, Nishiyama T, Kudo A, Fukayama M. Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol*. 2008 Aug;21(8):1044-53. doi: 10.1038/modpathol.2008.77. Epub 2008 May 16. PMID: 18487994
- Fulda, S. & K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." *Oncogene* 25(34): 4798-4811.

- Fulop Jr., T., Jacob, M.P., Vara, Z.S., Foris, G., Leovey, A. and Robert, L. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 92-98
- Gaggioli, C., S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J.F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai.. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. 2007 *Nat Cell Biol.* 9:1392-1400.
- Galli, A., D. Crabb, D. Price, E. Ceni, R. Salzano, C. Surrenti, and A. Casini. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 31:101-108.
- Gao, H.; Chen, X.; Du, X.; Guan, B.; Liu, Y.; Zhang, H. EGF enhances the migration of cancer cells by up-regulation of TRPM7. *Cell Calcium* 2011, 50, 559–568.
- Garfinkel L, Garfinkel D. Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved. *Magnesium* 4: 60–72, 1985.
- Gasparini G, Pellegatta M, Crippa S, Lena MS, Belfiori G, Doglioni C, Taveggia C, Falconi M *Cancers Nerves and Pancreatic Cancer: New Insights into a Dangerous Relationship.* (Basel). 2019 Jun 26;11(7). pii: E893. doi: 10.3390/cancers11070893.
- Gatenby, R.A., and R.J. Gillies.. A microenvironmental model of carcinogenesis. 2008 *Nature reviews. Cancer.* 8:56-61.
- Gatz, S. A. & L. Wiesmuller (2006). "p53 in recombination and repair." *Cell Death Differ* 13(6): 1003- 1016.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1493-505.
- Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y, Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3715-27. PMID: 12110584
- Goytain A, Hines RM, El-Husseini A, Quamme GA. NIPA1(SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem* 282: 8060–8068, 2007.
- Goytain A, Quamme GA. Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. *Physiol Genomics* 22: 382–389, 2005c.
- Goytain A, Quamme GA. Functional characterization of human SLC41A1, a Mg²⁺ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. *Physiol Genomics* 21: 337–342, 2005b.
- Goytain A, Quamme GA. Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. *BMC Genomics* 6: 48, 2005a.
- Green, D. R. & J. C. Reed (1998). "Mitochondria and Apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-1312.
- Greer JB, Whitcomb DC. Inflammation and pancreatic cancer: an evidence-based review. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug;9(4):411-8. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.011. Epub 2009 Jul 7. Review. PMID:19589727
- Grimes C, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem.* 2001 Sep;78(6):1219-32.
- Groenestege, W.M.; Thebault, S.; van der Wijst, J.; van den Berg, D.; Janssen, R.; Tejpar, S.; van den Heuvel, L.P.; van Cutsem, E.; Hoenderop, J.G.; Knoers, N.V.; et al. Impaired basolateral sorting of pro-EGF causes isolated recessive renal hypomagnesemia. *J. Clin. Investig.* 2007, 117, 2260–2267.
- Grubbs RD, Maguire ME. Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation. *Magnesium* 1987; 6: 113-27.
- Grubbs RD. Effect of epidermal growth factor on magnesium homeostasis in BC3H1 myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C1158–C1164, 1991.

- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Haren N, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C493–C502, 2009.
- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H, Scharenberg AM, Ouadid-Ahidouch H. Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur J Cancer*. 2013 Nov;49(17):3694-707. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.008. Epub 2013 Aug 1. PMID:23910495
- Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J, Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):297-306.
- Günther T. Na⁺/Mg²⁺ antiport in non-erythrocyte vertebrate cells. *Magnes Res* 2007; 20: 89-99.
- Gupta, G.P., and J. Massague. Cancer metastasis: building a framework. 2006. *Cell*. 127:679-695.
- Habisch, H., S. Zhou, M. Siech, and M.G. Bachem. Interaction of Stellate Cells with Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancers* 2010. 2:1661-1682.
- Halangk,W.,Lerch,M.M.,Brandt-Nedelev,B .,Roth,W.,Ruthenbuerger,M., Reinheckel,T. ,et al.(2000).Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen Activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin.Invest.* 106, 773–781.doi: 10.1172/JCI9411
- Hama K, Ohnishi H, Aoki H, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, et al. Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340: 742–50.
- Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, Ueda N, Mashima H, Satoh Y, et al. Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 315:905–11.
- Hamada S, Masamune A, Takikawa T, Suzuki N, Kikuta K, Hirota M, Hamada H, Kobune M, Satoh K, Shimosegawa T, Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 4;421(2):349-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.014. Epub 2012 Apr 9.
- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 ;21:309–22.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review PMID: 21376230
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review. No abstract available. PMID: 10647931
- Hanano T, Hara Y, Shi J, Morita H, Umabayashi C, Mori E, Sumimoto H, Ito Y, Mori Y, Inoue R. Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells. *J Pharmacol Sci*. 2004 Aug;95(4):403-19. Epub 2004 Jul 24.
- Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPM Family Channels in Cancer.Pharmaceuticals (Basel). 2018 Jun 7;11(2). pii: E58. doi: 10.3390/ph11020058. PMID:29875336
- Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML (2003) Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1510–1520. PMID: 12907463
- Haqq, J., L.M. Howells, G. Garcea, M.S. Metcalfe, W.P. Steward, and A.R. Dennison. 2014. Pancreatic stellate cells and pancreas cancer: Current perspectives and future strategies. *European journal of cancer*.

- Hardwick LJ, Philpott A Nervous decision-making: to divide or differentiate Trends Genet. 2014 Jun;30(6):254-61. doi: 10.1016/j.tig.2014.04.001. Epub 2014 Apr 30
- Hardy S, Uetani N, Wong N, Kostantin E, Labbe DP, Begin LR, Mes-Masson A, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. Oncogene 2014; doi:10.1038/onc.2014.33.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75: 805–816.
- Haugaard MM, Hesselkilde EZ, Pehrson S, Carstensen H, Flethoj M, Praestegaard KF, et al. Pharmacologic inhibition of small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels by NS8593 reveals atrial antiarrhythmic potential in horses. Heart Rhythm. 2015 Apr;12(4):825-35.
- Hermosura MC, Nayakanti H, Dorovkov MV, Calderon FR, Ryazanov AG, Haymer DS, Garruto RM. A TRPM7 variant shows altered sensitivity to magnesium that may contribute to the pathogenesis of two Guamanian neurodegenerative disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:11510–11515. PMID : 16051700
- Hidalgo, M., Pancreatic cancer. N Engl J Med, 2010. 362(17): p. 1605-17.
- Hille B. Ion Channel of Excitable Membranes. 2001,3rd edn. Sinauer Associates: Sunderland MA. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? 2006. Nat Rev Drug Discov5: 993–996.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alphasmooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell. 2001;12(9):2730-41.
- Hoenderop JG, Bindels RJ. Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. Physiology23: 32–40, 2008.
- Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in health and disease. J Am Soc Nephrol 16: 15–26, 2005.
- Hojeong Jeon, Eunpa Kim, and Costas P. Grigoropoulos Measurement of contractile forces generated by individual fibroblasts on self-standing fiber scaffolds Biomed Microdevices. 2011 Feb; 13(1): 107–115. doi: 10.1007/s10544-010-9475-5 PMID: 20862610
- Holley SL, Fryer AA, Haycock JW, Grubb SE, Strange RC, Hoban PR. Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. Carcinogenesis 2007; 11: 2268-73.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein & C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science 253(5015): 49-53.
- Hong BZ, Kang HS, So JN, Kim HN, Park SA, Kim SJ, Kim KR, Kwak YG. Vascular endothelial growth factor increases the intracellular magnesium. Biochem Biophys Res Commun 347: 496–501, 2006.
- Hong BZ, Park SA, Kim HN, Ma TZ, Kim HG, Kang HS, Kim HG, Kwak YG. Basic fibroblast growth factor increases intracellular magnesium concentration through the specific signaling pathways. Molecules Cells 28: 13–17, 2009.
- Hong, B.Z.; Kang, H.S.; So, J.N.; Kim, H.N.; Park, S.A.; Kim, S.J.; Kim, K.R.; Kwak, Y.G. Vascular endothelial growth factor increases the intracellular magnesium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 347, 496–501.
- Hruban, R.H., N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, M.R. Anver, A.V. Biankin, G.P. Boivin, E.E. Furth, T. Furukawa, A. Klein, D.S. Klimstra, G. Kloppel, G.Y. Lauwers, D.S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G.J. Offerhaus, L. Perez-Gallego, M. Redston, and D.A. Tuveson.. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. 2006 Cancer Res. 66:95-106.
- Hupp, T. R. & D. P. Lane (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." Current Biology 4(10): 865-875.
- Hurd TW, Otto EA, Mishima E, Gee HY, Inoue H, Inazu M, Yamada H, Halbritter J, Seki G, Konishi M, Zhou W, Yamane T, Murakami S, Caridi G, Ghiggeri G, Abe T, Hildebrandt F. Mutation of the

- Mg²⁺ transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype. *J Am Soc Nephrol* 24: 967–977, 2013.
- Hurle, J. M. (2014). Regenerative versus destructive cell death in developing systems and tissue homeostasis. *Bioessays*, 36
- Hutchison CJ (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3: 848-858.
- Huxley-Jones J, Foord SM, Barnes MR. Drug discovery in the extracellular matrix. *Drug Discov Today*. 2008 Aug;13(15-16):685-94. doi: 10.1016/j.drudis.2008.05.005. Epub 2008 Jun 24.
- Hwang, R.F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K.D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D.B. Evans, and C.D. Logsdon. 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 68:918-926.
- Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1216-9. doi: 10.1126/science.1176009.
- Icard, P., P. Kafara, J.M. Steyaert, L. Schwartz, and H. Lincet.. The metabolic cooperation between cells in solid cancer tumors. 2014 *Biochimica et biophysica acta*. 1846:216-225.
- Ide, T., Y. Kitajima, A. Miyoshi, T. Ohtsuka, M. Mitsuno, K. Ohtaka, Y. Koga, and K. Miyazaki..Tumor-stromal cell interaction under hypoxia increases the invasiveness of pancreatic cancer cells through the hepatocyte growth factor/c-Met pathway. *International journal of cancer*. 2006 *Journal international du cancer*. 119:2750-2759.
- Ikejiri, N.. The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. *The Kurume medical 1990 journal*. 37:67-81.
- Innocente, S. A., J. L. A. Abrahamson, J. P. Cogswell & J. M. Lee (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5): 2147-2152.
- Inoue K, Xiong ZG (2009) Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. *Cardiovasc Res* 83:547–557. doi: 10.1093/cvr/cvp153 PMID: 19454490
- Iseri LT, French JH. Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 108: 188–193, 1984.
- Izzedine, H.; Perazella, M.A. Adverse kidney effects of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Nephrol. Dial. Transpl.* 2017, 32, 1089–1097.
- Jablonska B, Aguirre A, Vandenbosch R, Belachew S, Berthet C, Kaldis P et al. (2007). Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *J Cell Biol* 179: 1231–1245.
- Jacob, M.P., Fulop, T., Foris, G. and Robert, L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 995-999.
- Jain, Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31 (2013) 2205–2218.
- Jansen C, Jaya Sahni, Sayuri Suzuki, F. David Horgen, Reinhold Penner, Andrea Fleig. The coiled-coil domain of zebrafish TRPM7 regulates Mg²⁺-nucleotide sensitivity *Sci Rep.* 2016; 6: 33459. Published online 2016 Sep 15. doi: 10.1038/srep33459
- Jansen C, Sahni J, Suzuki S, Horgen FD, Penner R, Fleig A. The coiled-coil domain of zebrafish TRPM7 regulates Mg²⁺-nucleotide sensitivity. *Sci Rep.* 2016 Sep 15;6:33459. doi: 10.1038/srep33459.PMID:27628598

- Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.* 2005;9:670–82.
- Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut.* 2002;51:579–84.
- Jaster, R.. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. 2004 *Mol Cancer.* 3:26.
- Jesnowski, R., D. Furst, J. Ringel, Y. Chen, A. Schrodell, J. Kleeff, A. Kolb, W.D. Schareck, and M. Lohr.. Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. 2005 *Lab Invest.* 85:1276-1291.
- Jiang HN, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu JM et al. Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. 2013. *PLoS ONE* 8(6): e67637. doi:10.1371/journal.pone.006763
- Jiang J, Li M, Yue L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol.* 2005 Aug;126(2):137-50. Epub 2005 Jul 11. PMID: 16009728
- Jiang J, Li MH, Inoue K, Chu XP, Seeds J, Xiong ZG. Transient receptor potential melastatin 7-like current in human head and neck carcinoma cells: role in cell proliferation. *Cancer Res* 67: 10929–10938, 2007.
- Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science.* 2008 Oct 31;322(5902):756-60. doi: 10.1126 /science1163493.PMID:18974357
- Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE. Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science* 322: 756–760, 2008.
- Jin J, Wu LJ, Jun J, Cheng X, Xu H, Andrews NC, Clapham DE. The channel kinase, TRPM7, is required for early embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 31;109(5):E225-33. doi: 10.1073/pnas.1120033109. Epub 2011 Dec 27. PMID:22203997
- Jin, Y. H., K. J. Yoo, Y. H. Lee & S. K. Lee (2000). "Caspase 3-mediated Cleavage of p21 WAF1/CIP1 Associated with the Cyclin A-Cyclin-dependent Kinase 2 Complex Is a Prerequisite for Apoptosis in SK-HEP-1 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 275(39): 30256-30263.
- Jones, P.A. and Y.A. DeClerck, Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin, and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res*, 1980. 40(9): p. 3222-7.
- Joyce, J.A., and J.W. Pollard.. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews.* 2009Cancer. 9:239-252.
- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. J. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. M. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.-Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer & J. M. Penninger (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." *Nature* 410(6828): 549-554.
- Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016 Aug 23;16(9):582-98. doi: 10.1038/nrc.2016.73. Review. PMID : 27550820
- Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W. Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun.* 1995;3:273–281.
- Karkampouna S, Ten Dijke P, Dooley S, Julio MK. TGF β signaling in liver regeneration. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(27):4103-13

- Katoh K1, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K J Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers.. *Cell Biol.* 2001 Apr 30;153(3):569-84.
- Kazi A, S Xiang, H Yang, D Delitto, J Trevino, R H. Y. Jiang, M Ayaz, H R. Lawrence, P Kennedy, and S M. Sebcticorresponding. GSK3 suppression upregulates β -catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumorsPublished online 2018 Dec 4. doi: 10.1038/s41467-018-07644-6
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie & A. R. Currie (1972). "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26(4): 239-257.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. 2010, *Cell*. 141:52-67.
- Kharaishvili, G., D. Simkova, K. Bouchalova, M. Gachechiladze, N. Narsia, and J. Bouchal. 2014. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer cell international*. 14:41.
- Khawar, J.H. Kim, H.J. Kuh, Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment, *J. Control Release* 201 (2015) 78–89.
- Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adiposederived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*. 2012;7:e30563.
- Kielty C. M., Sherratt M. J., Shuttleworth C. A. (2002). Elastic fibres. *J. Cell Sci.* 115 2817–2828
- Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T.4-hydroxy-2, 3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen- activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2344–51.
- Kikuta K, Satoh M, Kume K, Shimosegawa T. Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med.*200c3;199:69–84.
- Kikuta, K., A. Masamune, M. Satoh, N. Suzuki, K. Satoh, and T. Shimosegawa. 2006. Hydrogen peroxide activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in pancreatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 291:11-20.
- Kim BJ, Nah SY, Jeon JH, So I, Kim SJ, Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric cancer cells. . *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 Oct;109(4):233-9. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00706.x.Epub 2011 May 18.PMID:21443732
- Kim BJ, Nam JH, Kwon YK, So I, Kim SJ. The role of waixenicin A as transient receptor potential melastatin 7 blocker. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013 Feb;112(2):83-9. doi: 10.1111/j.1742 7843.2012.00929.x. Epub 2012 Sep 25. PMID:22901271
- Kim BJ, Park EJ, Lee JH, Jeon JH, Kim SJ, So I. Suppression of transient receptor potential melastatin 7 channel induces cell death in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2008 Dec;99(12):2502-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00982.x. Epub 2008 Nov 20. PMID:19032368
- Kim BJ. Involvement of Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channels in Sophorae Radix-induced Apoptosis in Cancer Cells: Sophorae Radix and TRPM7. *J Pharmacopuncture.* 2012 Sep;15(3):31-8. doi: 10.3831/KPI.2012.15.003.PMID :25780645
- Kim JH, Gelbard AS, Djordjevic B, Kim SH, Perez AG. Action of daunomycin on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells. *Cancer Res* 28: 2437–2442, 1968.
- Kim MC, Lee HJ, Lim B, Ha KT, Kim SY, So I, Kim BJ. Quercetin induces apoptosis by inhibiting MAPKs and TRPM7 channels in AGS cells.*Int J Mol Med.* 2014 Jun;33(6):1657-63. doi: 10.3892/ijmm.2014.1704. Epub 2014 Mar 18. PMID:24647664

- Klonowski-Stumpe, H., R. Reinehr, R. Fischer, U. Warskulat, R. Luthen, and D. Haussinger. 2003. Production and effects of endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 27:67-74.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green & D. D. Newmeyer (1997). "The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis." *Science* 275(5303): 1132-1136
- Kolisek M, Nestler A, Vormann J, Schweigel-Rontgen M. Human gene SLC41A1 encodes for the Na/Mg²⁺ exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C318–C326, 2012.
- Kolisek M, Sponder G, Mastrototaro L, Smorodchenko A, Launay P, Vormann J, Schweigel-Rontgen M. Substitution p A350V in Na/Mg²⁺exchanger SLC41A1, potentially associated with Parkinson's Disease, is a gain-of-function mutation. *PLoS One*8: e71096, 2013.
- Kolodecik T, Shugrue C, Ashat M, Thrower EC Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol*. 2014 Jan 16;4:415. doi: 10.3389/fphys.2013.00415. eCollection 2013. PMID: 24474939
- Koo J , Yue P, Deng X, Khuri F R., and Sun S-Y mTOR Complex 2 Stabilizes Mcl-1 Protein by Suppressing Its Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent and SCF-FBXW7-Mediated Degradation. *Mol Cell Biol*. 2015 Jul; 35(13): 2344–2355.
- Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*. 2008;8(2):110-25. doi: 10.1159/000123838. Epub 2008 Apr 1. Review. PMID: 18382097
- Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D. Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration *PLoS One*. 2012;7(12):e51878. doi: 10.1371/journal.pone.0051878. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23272184
- Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb 29; 367(1):116-23.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Clapham DE. The TRPM7 channel is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell*. 2014 May 22;157(5):1061-72. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.046. PMID: 24855944
- Kruse, M.L., P.B. Hildebrand, C. Timke, U.R. Folsch, and W.E. Schmidt. 2000. TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regulatory peptides*. 90:47-52.
- Kuehn, R., P.I. Lelkes, C. Bloechle, A. Niendorf, and J.R. Izbicki.. Angiogenesis, angiogenic growth factors, and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic diseases: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer. 1999 *Pancreas*. 18:96- 103.
- Kupffer C. Ueber Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Prof. Waldyer. *Arch mikr Anat*. 1876;12:353–358.
- Lameris AL, Hess MW, van Kruijsbergen I, Hoenderop JG, Bindels RJ. Omeprazole enhances the colonic expression of the Mg²⁺transporter TRPM6. *Pflügers Arch* 65: 1613–1620, 2013.
- Lancaster O.M., M. Le Berre, A. Dimitracopoulos, D. Bonazzi, E. Zlotek-Zlotkiewicz, R. Picone, et al. Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation *Developmental Cell*, 25 (3) (2013), pp. 270-283
- Landskron, G., M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, and M.A. Hermoso. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*. 2014:149185.
- Lang F, Föllner M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*. 2005 Jun;205(3):147-57.
- Langeslag, M.; Clark, K.; Moolenaar, W.H.; van Leeuwen, F.N.; Jalink, K. Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. *J. Biol. Chem.*2007, 282, 232–239.

- Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women. *JAMA* 293: 86–89, 2005.
- Lastraioli E, Iorio J, Arcangeli A. Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2685-702. doi: 10.1016/j.bbame.2014.12.016. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25542783
- Lee AYL, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, et al. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2018 Jan 23.
- Lee BC, Hong SE, Lim HH, Kim DH, Park CS. Alteration of the transcriptional profile of human embryonic kidney cells by transient overexpression of mouse TRPM7 channels. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(3-4):313-26. doi: 10.1159/000327958. Epub 2011 Apr 1. PMID:21471721
- Lee H, Lim C, Lee J, Kim N, Bang S, Lee H, et al. TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem*. 2008;104:1065–74.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1317-72. Review. PMID:10508236
- Leng T, Lin S, Xiong Z, Lin J. Lidocaine suppresses glioma cell proliferation by inhibiting TRPM7 channels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2017;9(2):8-15.
- Leng TD, Li MH, Shen JF, Liu ML, Li XB, Sun HW, Branigan D, Zeng Z, Si HF, Li J, Chen J, Xiong ZG. Suppression of TRPM7 inhibits proliferation, migration, and invasion of malignant human glioma cells. *CNS Neurosci Ther*. 2015 Mar;21(3):252-61. doi: 10.1111/cns.12354. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25438992
- Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol*. 1992 May;45(5):416-9.
- Levine, A. J. "p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division." (1997). *Cell* 88(3): 323-331.
- Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ. Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* 475: 471–476, 2011.
- Li M, Jiang J, Yue L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* 127: 525–537, 2006.
- Li, H., H. Zhu, C.-j. Xu & J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis." *Cell* 94(4): 491-501.
- Li, H., H. Zhu, C.-j. Xu & J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis." *Cell* 94(4): 491-501.
- Li, H., X. Fan, and J. Houghton.. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. 2007 *Journal of cellular biochemistry*. 101:805-815.
- Liao, J. Liu, P. Lin, T. Shi, R.K. Jain, L. Xu, TGF-beta blockade controls ascites by preventing abnormalization of lymphatic vessels in orthotopic human ovarian carcinoma models, *Clin. Cancer Res*. 17 (2011) 1415–1424.
- Lin CM, Ma JM, Zhang L, Hao ZY, Zhou J, Zhou ZY, Shi HQ, Zhang YF, Shao EM, Liang CZ. Inhibition of Transient Receptor Potential Melastain 7 Enhances Apoptosis Induced by TRAIL in PC-3 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(10):4469-75. PMID: 26028116
- Lin, J.; Zhou, S.; Zhao, T.; Ju, T.; Zhang, L. TRPM7 channel regulates ox-LDL-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via MEK-ERK pathways. *FEBS Lett*. 2016, 590, 520–532.

- Liston, P., W. G. Fong & R. G. Korneluk (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." *Oncogene* 22(53): 8568-8580.
- Liu B, Qin F. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 2005 Feb 16;25(7):1674-81. PMID: 15716403
- Liu D, Liman ER. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):15160-5. Epub 2003 Dec 1. PMID:14657398
- Liu H, Li J, Huang Y, Huang C. Inhibition of transient receptor potential melastain 7 channel increases HSCs apoptosis induced by TRAIL. *Life Sci.* 2012 Apr 20;90(15-16):612-8. doi: 10.1016/j.lfs.2012.02.012. Epub 2012 Mar 1. PMID:22406504
- Liu W, Su LT, Khadka DK, Mezzacappa C, Komiya Y, Sato A, Habas R, Runnels LW. TRPM7 regulates gastrulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol.* 2011 Feb 15;350(2):348-57. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.034. Epub 2010 Dec 9. PMID: 21145885
- Liu, L.;Wu, N.;Wang, Y.; Zhang, X.; Xia, B.; Tang, J.; Cai, J.; Zhao, Z.; Liao, Q.;Wang, J. TRPM7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer through the calcium-related PI3K / AKT oncogenic signaling. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019, 38, 106.
- Liu, M.; Inoue, K.; Leng, T.; Guo, S.; Xiong, Z.G. TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways. *Cell Signal* 2014, 26, 2773–2781.
- Liu, S. Liao, B. Diop-Frimpong, W. Chen, S. Goel, K. Naxerova, M. Ancukiewicz, Y. Boucher, R.K. Jain, L. Xu, TGF-beta blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 16618–16623.
- Lostron AJ, Krahl ME. Magnesium, a second messenger for insulin: ion translocation coupled to transport activity. *Adv Enzyme Regul* 12: 73–81, 1974.
- Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006. 20(2): p. 197-209.
- Lu, D.; Qu, J.; Sun, L.; Li, Q.; Ling, H.; Yang, N.; Ma, T.; Wang, Q.; Li, M.; Zhang, K.; et al. Ca²⁺/Mg²⁺ homeostasis-related TRPM7 channel mediates chondrocyte hypertrophy via regulation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 2017, 16, 5699–5705.
- Lunardi, S., N.B. Jamieson, S.Y. Lim, K.L. Griffiths, M. Carvalho-Gaspar, O. Al-Assar, S. Yameen, R.C. Carter, C.J. McKay, G. Spoletini, S. D'Ugo, M.A. Silva, O.J. Sansom, K.P. Janssen, R.J. Muschel, and T.B. Brunner.. IP-10/CXCL10 induction in human pancreatic cancer stroma influences lymphocytes recruitment and correlates with poor survival. *Oncotarget.* 2014 5:11064-11080.
- Luo, Y.;Wu, J.Y.; Lu, M.H.; Shi, Z.; Na, N.; Di, J.M. Carvacrol Alleviates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion through Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, 1469693.
- Luttenberger, T., A. Schmid-Kotsas, A. Menke, M. Siech, H. Beger, G. Adler, A. Grunert, and M.G. Bachem.. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *2000 Lab Invest.* 80:47-55.
- M. Gschwendt, H.J. Muller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke, F. Marks, Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 93–98. PMID: 8123051
- Mahadevan, D., and D.D. Von Hoff. 2007. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 6:1186-1197.

- Malumbres M, Barbacid M, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66. doi: 10.1038/nrc2602.
- Mandt T, Song Y, Scharenberg AM, Sahni J SLC41A1 Mg(2+) transport is regulated via Mg(2+)-dependent endosomal recycling through its N-terminal cytoplasmic domain. *Biochem J*. 2011 Oct 1;439(1):129-39. doi: 10.1042/BJ20110807.PMID:21696366
- Mangiarotti R, Danova M, Alberici R, Pellicciari C (1998) All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 77: 186–191.
- Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β 1-integrin signaling. *Cancer Res*. 2011 May 15;71(10):3453-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1633. Epub 2011 May 10. PMID: 21558392
- Marchetti, P., T. Hirsch, N. Zamzami, M. Castedo, D. Decaudin, S. A. Susin, B. Masse & G. Kroemer "Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis." (1996). *The Journal of Immunology* 157(11): 4830-4836.
- Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2002b;277:141–7.
- Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh A, Shimosegawa T. Alcohol activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002a;302:36–42.
- Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2003a;140:1292–302.
- Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate blocks PDGF-induced proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3368–74.
- Masamune A, Kikuta K, Suzuki N, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. A c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 blocks activation of pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310:520–7.
- Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells express toll-like receptors. *J Gastroenterol*. 2008;43:352–62.
- Masamune A, Satoh M, Hirabayashi J, Kasai K, Satoh K, Shimosegawa T. Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G729–36.
- Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:8–14.
- Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2005b ;11:3385–91.
- Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2005a;11:6144–51.
- Masamune, A., A. Satoh, T. Watanabe, K. Kikuta, M. Satoh, N. Suzuki, K. Satoh, and T. Shimosegawa. 2010. Effects of ethanol and its metabolites on human pancreatic stellate cells. *Digestive diseases and sciences*. 55:204-211.
- Masamune, A., and T. Shimosegawa.. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol*. 2009b 44:249-260.

- Masamune, A., K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh, M. Hirota, and T. Shimosegawa. 2008a. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 295:G709-717.
- Masamune, A., K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh, M. Hirota, S. Hamada, and T. Shimosegawa.. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut* 2009. 58:550-559.
- Mato E, Lucas M, Petriz J, Gomis R, Novials A. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem J.* 2009 Jun 26;421(2):181-91. doi: 10.1042/BJ20081466. PMID:19379129
- Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A, D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 1994 Apr 15;269(15):11030-6.
- Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, Tomizawa K, Matsui H, Chait BT, Cahalan MD, Nairn AC. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20793-803. Epub 2005 Mar 21. PMID: 15781465 PMID:15781465
- Matthews H.K., U. Delabre, J.L. Rohn, J. Guck, P. Kunda, B. Baum Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression *Developmental Cell*, 23 (2) (2012), pp. 371-383
- Maurer U , F Preiss, P Brauns-Schubert, L Schlicherand ,C Charvet GSK-3 – at the crossroads of cell death and survival, 2014. Published by The Company of Biologists Ltd | *Journal of Cell Science* (2014) 127, 1369–1378 doi:10.1242/jcs.138057
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E. and Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* 21, 749-760.
- Mazur, P.K., and J.T. Siveke.. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. 2012 *Gut.* 61:1488-1500.
- McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, et al. Pancreatic stellate cell migration: role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochem Pharmacol.*2004;67:1215–25.
- McCarroll JA, Phillips PA, Park S, Doherty E, Pirola RC, Wilson JS, et al. Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas.* 2003;27:150–60
- McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut.* 2006; 55:79–89.
- McNeill MS, Paulsen J, Bonde G, Burnight E, Hsu MY, Cornell RA. Cell death of melanophores in zebrafish *trpm7* mutant embryos depends on melanin synthesis. *J Invest Dermatol.* 2007 Aug;127(8):2020-30. Epub 2007 Feb 8. PMID:17290233
- Medema, J. P., R. E. M. Toes, C. Scaffidi, T. S. Zheng, R. A. Flavell, C. J. M. Melief, M. E. Peter, R. Offringa & P. H. Krammer (1997). "Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis." *European Journal of Immunology* 27(12): 3492- 3498.
- Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2012;12:306.
- Mei ZZ, Xia R, Beech DJ, Jiang LH. *J Biol Chem.* Intracellular coiled-coil domain engaged in subunit interaction and assembly of melastatin-related transient receptor potential channel 2. 2006 Dec 15;281(50):38748-56. Epub 2006 Oct 23. PMID:17060318

- Meng, X.; Cai, C.; Wu, J.; Cai, S.; Ye, C.; Chen, H.; Yang, Z.; Zeng, H.; Shen, Q.; Zou, F. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Lett.* 2013, 333, 96–102.
- Mews, P., P. Phillips, R. Fahmy, M. Korsten, R. Pirola, J. Wilson, and M. Apte.. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *2002 Gut.* 50:535-541.
- Middelbeek J, Clark K, Venselaar H, Huynen MA, van Leeuwen FN, The alpha-kinase family: an exceptional branch on the protein kinase tree. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Mar;67(6):875-90. doi: 10.1007/s00018-009-0215-z. Epub 2009 Dec 12. PMID : 20012461
- Middelbeek J, Visser D, Henneman L, Kamermans A, Kuipers AJ, Hoogerbrugge PM, Jalink K, van Leeuwen FN. TRPM7 maintains progenitor-like features of neuroblastoma cells: implications for metastasis formation. *Oncotarget.* 2015 Apr 20;6(11):8760-76. PMID: 25797249
- Mierke, C.T. Physical break-down of the classical view on cancer cell invasion and metastasis. 2012. *Eur J Cell Biol.* 92:89-104.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska & U. M. Moll (2003). "p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria." *Molecular Cell* 11(3): 577-590.
- Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, Regalado ES, Cao J, Reid AJ. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. *Genet Med.* 2010;12(4):196-203.
- Mishra R, Rao V, Ta R, Shobeiri N, Hill CE. Mg²⁺- and MgATP-inhibited and Ca²⁺/ calmodulin-sensitive TRPM7-like current in hepatoma and hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G687–G694, 2009.
- Mitchison T.J. Actin based motility on retraction fibers in mitotic PtK2 cells *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22 (2) (1992), pp. 135-151
- Mittermeier L, Demirkhanyan L, Stadlbauer B, Breit A, Recordati C, Hilgendorff A, M Matsushita, A Braun, DG. Simmons, E Zakharian, T Gudermann, V Chubanov. TRPM7 is the central gatekeeper of intestinal mineral absorption essential for postnatal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Mar 5; 116(10): 4706–4715. Published online 2019 Feb 15. doi: 10.1073/pnas.1810633116
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H. Wang, H. Lin, D. Liebermann, B. Hoffman & J. Reed (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* 9(6): 1799-1805.
- Mochizuki, S., B. Brassart, and A. Hinek, Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 44854-63.
- Moffitt RA, Marayati R1, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, Rashid NU1, Williams LA, Eaton SC, Chung AH, Smyla JK, Anderson JM, Kim HJ, Bentrem DJ, Talamonti MS, Iacobuzio-Donahue CA, Hollingsworth MA6, Yeh JJ. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet.* 2015 Oct;47(10):1168-78. doi: 10.1038/ng.3398. Epub 2015 Sep 7.
- Moir JA, Mann J, White SA The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer. *Surg Oncol.* 2015 Sep;24(3):232-8. doi: 10.1016/j.suronc.2015.05.002. Epub 2015 May 19. Review. PMID : 26080604
- Moldovan GL1, Pfander B, Jentsch S, PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 2007 May 18;129(4):665-79.
- Moll, U. M. & O. Petrenko (2003). "The MDM2-p53 Interaction." *Molecular Cancer Research* 1(14): 1001-1008.

- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J GenPhysiol* 121: 49–60, 2003.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):595-8.PMID: 11893331
- Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G. *Science*. Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. 1985 Nov 29;230(4729):1040-3. PMID:3933112
- Montell C. Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-sensitive TRPM channels. *Curr Biol*. 2003 Oct 14;13(20):R799-801.Review. PMID:14561419
- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J. M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 15–26 (2011).
- Moroni, M., E. Hickman, E. Lazzerini Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Müller & K. Helin (2001). "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." *Nat Cell Biol.* 3(6): 552-558.
- Moscarelli, P., et al., Structural characterization and biological properties of the amyloidogenic elastin-like peptide (VGGVG)₃. *Matrix Biol*, 2014. 36: p. 15-27.
- Moulding D.A., E. Moeendarbary, L. Valon, J. Record, G.T. Charras, A.J. Thrasher Excess F-actin mechanically impedes mitosis leading to cytokinesis failure in X-linked neutropenia by exceeding Aurora B kinase error correction capacity *Blood*, 120 (18) (2012), pp. 3803-3811
- Nadler, M.J., et al., LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 2001. 411(6837):p. 590-5.
- Nadolni W, Zierler S.The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. *Cells*. 2018 Aug 17;7(8). pii: E109. doi: 10.3390/cells7080109.Review.PMID:30126133
- Nair AV, Hocher B, Verkaart S, van Zeeland F, Pfaff T, Slowinski T, Chen YP, Schlingmann KP, Schaller A, Gallati S, Bindels RJ, Konrad M, Hoenderop JG. Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 11324–11329, 2012.
- Nakano, K. & K. H. Vousden (2001). "PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53." *Molecular Cell* 7(3): 683-694.
- Nasulewicz A, Wietrzyk J, Wolf FI, Dzimira S, Madej J, Maier JAM, Rayssiguier Y, Mazur A, Opolski A. Magnesium deficiency inhibits primary tumor growth but favors metastasis in mice. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1739: 26-32.
- Neesse, A., K.K. Frese, T.E. Bapiro, T. Nakagawa, M.D. Sternlicht, T.W. Seeley, C. Pilarsky, D.I. Jodrell, S.M. Spong, and D.A. Tuveson.. CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. 2013 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:12325-12330.
- Neuzillet C, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E, Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*. 2014 Jan 15;5(1):78-94. ,PMID: 24393789
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, Erkan M, Kleeff J, Wilson J, Apte M, Tosolini M, Wilson AS, Delvecchio FR, Bousquet C, Paradis V, Hammel P, Sadanandam A, Kocher HM. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*. 2019 May;248(1):51-65. doi: 10.1002/path.5224. Epub 2019 Feb 22. PMID: 30575030
- Nielsen FH. Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. *Nutr Rev* 2010; 68: 333-40.

- Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S, Identification of markers for quiescent pancreatic stellate cells in the normal human pancreas. *Histochem Cell Biol.* 2017 Oct;148(4):359-380. doi: 10.1007/s00418-017-1581-5. Epub 2017 May 25, PMID: 28540429
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbord R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, Yamada SD, Peter ME, GwinK, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17:1498–503
- Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R, Voets T. The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *EMBO J.* 2006 Feb 8;25(3):467-78. Epub 2006 Jan 19. PMID:16424899
- Nishida A, Andoh A, Shioya M, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Fujiyama Y. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates interleukin-32alpha induction in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294:G831–8.
- Numata T, Okada Y. Proton conductivity through the human TRPM7 channel and its molecular determinants. *J Biol Chem.* 2008 May 30;283(22):15097-103. doi: 10.1074/jbc.M709261200. Epub 2008 Apr 4. PMID: 18390554
- Nuñez-Villena F, Becerra A, Echeverría C, Briceño N, Porras O, Armisen R, Varela D, Montorfano I, Sarmiento D, Simon F. Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Nov 1;15(9):2425-38. doi: 10.1089/ars.2010.3825. Epub 2011 Jun 24. PMID:21539414
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi & N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis." *Science* 288(5468): 1053-1058.
- Ogami, Y., and Otsuki, M. Exocrine pancreatic physiology : overview. 1998. *Pancreas* 16, 265–272. doi:10.1097/00006676-199804000-00010
- Oh HG, Chun YS, Park CS, Kim TW, Park MK, Chung S Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jul 17-24;463(1-2):7-12. doi:10.1016/j.bbrc.2015.05.007. Epub 2015 May 15. PMID:25983327
- Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014;211:1503–23.
- Öhlund D, Handy-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio II, Hwang CI, Tiriach H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 2017 Mar 6;214(3):579-596. doi: 10.1084/jem.20162024. Epub 2017 Feb 23
- Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J Biol Chem.* 2004;279: 9973–8.
- Ohnishi, N., T. Miyata, H. Ohnishi, H. Yasuda, K. Tamada, N. Ueda, H. Mashima, and K. Sugano. 2003. Activin A is an autocrine activator of rat pancreatic stellate cells: potential therapeutic role of follistatin for pancreatic fibrosis. *Gut.* 52:1487-1493.
- Okamoto-Inoue M, Kamada S, Kimura G, Taniguchi S. The induction of smooth muscle a actin in a transformed rat cell line suppresses malignant properties in vitro and in vivo ;. *Cancer Letters* 142 (1999) PMID: 10463773

- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R et al. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35: 25–31
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;84(3):767–801.
- P Molee, P Adisakwattana, O Reamtong, S Petmitr, T Sricharunrat, N Suwandittakul, U Chaisri, Up-regulation of AKAP13 and MAGT1 on cytoplasmic membrane in progressive hepatocellular carcinoma: a novel target for prognosis *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(9): 9796–9811. Published online 2015 Sep 1.
- Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell.. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar;27 Suppl 2:127-34. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07013.x. Review. Erratum in: *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 May;27(5):990. Edderkoui, Mouad [corrected to Edderkaoui, Mouad]. PMID: 22320930
- Paolo, P., R. Anna, R. Rosario & G. Carlotta (2008). "Ca²⁺ Signaling, Mitochondria and Cell Death." *Current Molecular Medicine* 8(2): 119-130.
- Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, Minke B. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*. 2009 Mar;45(3):300-9. doi: 10.1016/j.ceca.2008.11.009. Epub 2009 Jan 9. PMID:19135721
- Parrish, J., L. Li, K. Klotz, D. Ledwich, X. Wang & D. Xue (2001). "Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*." *Nature* 412(6842): 90-94.
- Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM, Blain KM, Mansfield DC, Shahrabi M, Heidari M, Aref P, Abbasi M, Michaelides M, Moore AT, Kirkham J, Inglehearn CF. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 84: 266–273, 2009.
- Patel T, Bronk SF, Gores GJ. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate- induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest*. 1994;94:2183–92
- Paumi CM, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. Glutathione S- activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). *Biochemistry*2004; 43: 2345-52. transferases (GSTs) inhibit transcriptional
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):233-52.Review. PMID:16098585
- Pelletier S, Julien C, Popoff MR, Lamarche-Vane N, Meloche S. Cyclic AMP induces morphological changes of vascular smooth muscle cells by inhibiting a Rac-dependent signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2005 Aug;204(2):412-22. PMID: 15706595
- Penner R, Fleig A. The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol*. 2007(179):313-28.
- Petersen E., Wagberg F., Angquist K. A. (2002). Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*. 24 440–444. 10.1053/ejvs.2002.1750
- Petersen, O.H.,Gerasimenko, O.V.,Tepikin,A.V., and Gerasimenko, J.V.(2011). Aberrant Ca(2+) signalling through acidic calcium stores in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* 50, 193–199.doi:10.1016/j.ceca.2011.02.010
- Phillips, P.A., J.A. McCarroll, S. Park, M.J. Wu, R. Pirola, M. Korsten, J.S. Wilson, and M.V. Apte. 2003. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*. 52:275-282.

- Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R, Bottinger EP, Roberts AB. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jun 8;276(23):19945-53. Epub 2001 Mar 21.
- Pierantoni, C., et al., Pancreatic cancer: progress in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. 67(1): p. 27-38.
- Piskacek M, Zotova L, Zsurka G, Schweyen RJ. Conditional knockdown of hMRS2 results in loss of mitochondrial Mg2uptake and cell death. *J Cell Mol Med* 13: 693–700, 2009.
- Polok B, Escher P, Ambresin A, Chouery E, Bolay S, Meunier I, Nan F, Hamel C, Munier FL, Thilo B, Megarbane A, Schorderet DF. Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 84: 259–265, 2009.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):107-21. doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.005. Epub 2010 Feb 16. Review.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(8):p.609-18.
- Price MA, Tullius TD. 11. Using hydroxyl radical to probe DNA structure. In: *Methods in Enzymology*, edited by David M. J. Lilley. New York: Academic, 1992, p. 194–219.
- Qin X, Yue Z, Sun B, Yang W, Xie J, Ni E, Feng Y, Mahmood R, Zhang Y, Yue L. Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *Br J Pharmacol*. 2013 Mar;168(6):1294-312.doi: 10.1111/bph.12012.PMID:23145923
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1423-37. doi: 10.1038/nm.3394. Review. PMID : 24202395
- Quigley GJ, Teeter MM, Rich A. Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 64–68, 1978.
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014 Jun 01;74(11):2913-21.
- Ravagnan, L., T. Roumier & G. Kroemer (2002). "Mitochondria, the killer organelles and their weapons." *Journal of Cellular Physiology* 192(2): 131-137.
- Rebours, V., M. Albuquerque, A. Sauvanet, P. Ruzsniowski, P. Levy, V. Paradis, P. Bedossa, and A. Couvelard.. Hypoxia pathways and cellular stress activate pancreatic stellate cells: development of an organotypic culture model of thick slices of normal human pancreas. 2013 *PloS one*. 8:e76229.
- Riopel, M.M., J. Li, S. Liu, A. Leask, and R. Wang.. beta1 integrin-extracellular matrixinteractions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function. 2013 *Lab Invest*. 93:31-40.
- Ritchie, V.C. Ramani, Y. Ren, A. Naggi, G. Torri, B. Casu, S. Penco, C. Pisano, P. Carminati, M. Tortoreto, F. Zunino, I. Vlodyavsky, R.D. Sanderson, Y. Yang, SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis, *Clin. Cancer Res*. 17 (2011) 1382–1393.
- Rohacs T. Teaching resources. TRP channels. *Sci STKE*. 2005 May 3;2005(282):tr14.PMID: 15870425
- Romagnani A, Vettore V, Rezzonico-Jost T, Hampe S, Rottoli E, Nadolni W, Perotti M, Meier MA, Hermanns C, Geiger S, Wennemuth G, Recordati C Matsushita M, Muehlich S, Proietti M, Chubanov V3, Gudermann T, Grassi F, Zierler S. TRPM7 kinase activity is essential for T cell colonization and alloreactivity in the gut. *Nat Commun*. 2017 Dec 4;8(1):1917. doi: 10.1038/s41467-017-01960-z. PMID: 29203869
- Romani A, Scarpa A. Regulation of cell Magnesium *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298:1–12. PMID : 1524417

- Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458: 90-102.
- Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Aug 1;512(1):1-23.
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW (1996) A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. *J Cell Biol* 134: 67–80.
- Rosca, J.E. Koskimaki, C.G. Rivera, N.B. Pandey, A.P. Tamiz, A.S. Popel, Antiangiogenic peptides for cancer therapeutics, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (2011) 1101–1116.
- Roumane, A., Berthenet, K., El Fassi, C., & Ichim, G. (2018). Caspase-independent cell death does not elicit a proliferative response in melanoma cancer cells. *BMC Cell Biology*, 19(1), 11.
- Rubin AH, Terasaki M, Sanui H. Magnesium reverses inhibitory effects of calcium deprivation on coordinate response of 3T3 cells to serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4379–4383, 1978.
- Rubin H. Central role for magnesium in coordinate control of metabolism and growth in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3551–3555, 1975.
- Rubin H. The logic of Membrane, magnesium, Mitosis(MMM) model for the regulation of animal cell proliferation. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458: 16-23.
- Rubin H. The membrane, magnesium, mitosis (MMM) model of cell proliferation control. *Magnesium Res* 18: 268–274, 2005.
- Runnels, L.W., L. Yue, and D.E. Clapham, TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, 2001. 291(5506): p. 1043-7.
- Runnels, L.W.; Yue, L.; Clapham, D.E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4, 329–336.
- Ryan AJ, O'Brien FJ. Insoluble elastin reduces collagen scaffold stiffness, improves viscoelastic properties, and induces a contractile phenotype in smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2015 Dec;73:296-307. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.003. Epub 2015 Sep 25.
- Ryazanova, M.V. Dorovkov, A. Ansari, A.G. Ryazanov, Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3708–3716.
- Rybarczyk P, Vanlaeys A, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H, Gautier M. The Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion through the Hsp90 α /uPA/MMP2 pathway. *Neoplasia*. 2017 Apr;19(4):288-300. doi: 10.1016/j.neo.2017.01.004. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28284058
- Rybarczyk, P., et al., Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer*, 2012. 131(6): p. E851-61.
- Saelens, X., N. Festjens, L. V. Walle, M. v. Gulp, G. v. Loo & P. Vandenabeele (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* 23(16): 2861-2874.
- Sah R, Mesirca P, Mason X, Gibson W, Bates-Withers C, Van den Boogert M, et al. Timing of myocardial trpm7 deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction, and repolarization. *Circulation*. 2013 Jul 9;128(2):101-14.
- Sahmoun AE, Singh BB. Does a higher ratio of serum calcium to magnesium increase the risk for postmenopausal breast cancer? *Med Hypotheses* 2010; 75: 315-8.
- Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J*. 2007 Jan 15;401(2):505-13. PMID:16984228
- Sahni J, Scharenberg AM. TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signaling in lymphocytes. *Cell Metab*. 2008 Jul;8(1):84-93. doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.002. PMID:18590694

- Sahni J, Tamura R, Sweet IR, Scharenberg AM. TRPM7 regulates quiescent/proliferative metabolic transitions in lymphocytes. *Cell Cycle*. 2010 Sep 1;9(17):3565-74. doi: 10.4161/cc.9.17.12798. Epub 2010 Sep 25 PMID:20724843
- Saltarella, I.; Frassanito, M.A.; Lamanuzzi, A.; Brevi, A.; Leone, P.; Desantis, V.; Di Marzo, L.; Bellone, M.; Derudas, D.; Ribatti, D.; et al. Homotypic and Heterotypic Activation of the Notch Pathway in Multiple Myeloma-Enhanced Angiogenesis: A Novel Therapeutic Target? *Neoplasia* 2019, 21, 93–105.
- Sanui H, Rubin AH. Membrane bound and cellular cationic changes associated with insulin stimulation of cultured cells. *J Cell Physiol* 96: 265–278, 1978.
- Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*. 1990 Aug;63(2):144-61. Review. No abstract available. PMID: 2116562
- Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer & W. S. El-Deiry (2002). "p53 regulation by p53 contributes to chemosensitivity." *Nat Cell Biol* 4(11): 842-849.
- Scandolera A, Odoul L, Salesse S, Guillot A, Blaise S, Kawecky C, Maurice P, El Btaouri H, Romier-Crouzet B, Martiny L, Debelle L, Duca L. The Elastin Receptor Complex: A Unique Matricellular Receptor with High Anti-tumoral Potential. *Front Pharmacol*. 2016 Mar 4;7:32. doi: 10.3389/fphar.2016.00032. eCollection 2016.
- Scarlett CJ, Salisbury EL, Biankin AV, Kench J. Precursor lesions in pancreatic cancer: morphological and molecular pathology. *Pathology*. 2011 Apr;43(3):183-200. doi: 10.1097/PAT.0b013e3283445e3a. Review. PMID: 21436628
- Schäfer S, Ferioli S, Hofmann T, Zierler S, Gudermann T, Chubanov V. Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflugers Arch*. 2016 Apr;468(4):623-34. doi: 10.1007/s00424-015-1772-7. Epub 2015 Dec 16. PMID:2666931
- Scharenberg AM. TRPM2 and TRPM7: channel/enzyme fusions to generate novel intracellular sensors. *Pflugers Arch*. 2005 Oct;451(1):220-7. Epub 2005 Jul 7. PMID: 16001276
- Schiffers PM, Henrion D, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Langa-Vuves F, van Essen H, Fazzi GE, Levy BI, De Mey JG. Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:611–6
- Schildmeyer LA, Braun R, Taffet G, DeBiasi M, Burns AE, Bradley A, et al. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. *FASEB J*. 2000;14(14):2213-20.
- Schilling T, Miralles F, Eder C. TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages. *J Cell Sci*. 2014 Nov 1;127(Pt 21):4561-6. doi: 10.1242/jcs.151068. Epub 2014 Sep 9. PMID:25205764
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*. 2002;31:166–170.
- Schmitz C, Dorovkov MV, Zhao X, Davenport BJ, Ryazanov AG, Perraud AL. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J Biol Chem*. 2005 Nov 11;280(45):37763-71. Epub 2005 Sep 2. PMID: 16150690
- Schmitz C1, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):191-200. PMID: 12887921
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology*. 2001 Jul;34(1):89-100.

- Schneider, E., A. Schmid-Kotsas, J. Zhao, H. Weidenbach, R.M. Schmid, A. Menke, G. Adler, J. Waltenberger, A. Grunert, and M.G. Bachem.. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol* 2001 *Cell Physiol*. 281:C532-543.
- Schneiderhan, W., F. Diaz, M. Fundel, S. Zhou, M. Siech, C. Hasel, P. Moller, J.E. Gschwend, T. Seufferlein, T. Gress, G. Adler, and M.G. Bachem. 2007. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *Journal of cell science*. 120:512-519.
- Schober, M., R. Jesenofsky, R. Faissner, C. Weidenauer, W. Hagmann, P. Michl, R.L. Heuchel, S.L.Haas, and J.M. Lohr. 2014. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*. 6:2137-2154.
- Schrag D, Chung KY, Flombaum C, Saltz L. Cetuximab therapy and symptomatic hypomagnesemia. *J Natl Cancer Inst* 97: 1221–1224, 2005.
- Sengupta, S. & C. C. Harris (2005). "p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 44-55.
- Senior, R.M., G.L. Griffin, and R.P. Mecham, Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest*, 1980. 66(4): p. 859-62.
- Seo, P. Delnero, C. Fischbach, In vitro models of tumor vessels and matrix: engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70 (2014) 205–216.
- Sgambato A, Faraglia B, Ardito R, Torsello A, Boninsegna A, Cittadini A, Wolf FI. Isolation of normal epithelial cells adapted to grow at nonphysiological concentration of magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 752-7.
- Sgambato A, Wolf FI, Faraglia B, Cittadini A. Magnesium depletion causes growth inhibition, reduced expression of cyclin D1, and increased expression of P27Kip1 in normal but not in transformed mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 1999; 180: 245-54.
- Shakeri, A., Cicero, A. F., Panahi, Y., Mohajeri, M., & Sahebkar, A. (2018). Curcumin: A naturally occurring autophagy modulator. *Journal of Cellular Physiology.*, 234, 5643– 5654.
- Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SL, Williams EJ, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol*. 2002;160:1787–98.
- Shen B, Nolan JP, Sklar LA, Park MS. Essential amino acids for substrate binding and catalysis of human flap endonuclease 1. *J Biol Chem* 271: 9173–9176, 1996.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependentkinases. *Genes Dev* 9: 1149–1163.
- Sherr CJ.. Cancer cell cycle. 1996 *Science* 274: 1672–1677.
- Shimizu K, Kobayashi M, Tahara J, Shiratori K. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2005;128:2105–18.
- Shimizu K, Shiratori K, Hayashi N, Kobayashi M, Fujiwara T, Horikoshi H. Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. *Pancreas*.2002;24:184–90.
- Shimizu K. Pancreatic stellate cells: molecular mechanism of pancreatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar;23 Suppl 1:S119-21. doi: 10.1111/j.1440 1746.2007.05296.x. PMID: 18336654
- Shimoda, M., K.T. Mellody, and A. Orimo.. Carcinoma-associated fibroblasts are a ratelimiting determinant for tumour progression. 2010 *Semin Cell Dev Biol*. 21:19-25.

- Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed Mg²⁺-selective fluorescent probe enables visualization of Mg²⁺dynamics in mitochondria. *PLoS One* 6: e23684, 2011.
- Shinozaki, S., H. Ohnishi, K. Hama, H. Kita, H. Yamamoto, H. Osawa, K. Sato, K. Tamada, H. Mashima, and K. Sugano.. Indian hedgehog promotes the migration of rat activated pancreatic stellate cells by increasing membrane type-1 matrix metalloproteinase on the plasma membrane. 2008 *J Cell Physiol.* 216:38-46.
- Shiratsuchi, E., Ura, M., Nakaba, M., Maeda, I., and Okamoto, K. (2010). Elastin peptides prepared from piscine and mammalian elastic tissues inhibit collagen-induced platelet aggregation and stimulate migration and proliferation of human skin fibroblasts. *J. Peptide Sci.* 16, 652–658. doi:10.1002/psc.1277
- Shmueli, A. & M. Oren (2004). "Regulation of p53 by Mdm2: Fate Is in the Numbers." *Molecular Cell* 13(1): 4-5.
- Shrikhande, S.V., Martignoni, M.E., Shrikhande, M., Kappeler, A., Ramesh, H., Zimmermann, A., et al. (2003). Comparison of histological features and inflammatory cell reaction in alcoholic, idiopathic and tropical chronic pancreatitis. *Br. J. Surg.* 90, 1565–1572. doi:10.1002/bjs.4353
- Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 62, 220–241. doi:10.3322/caac.21149
- Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 2004;23: 8017–23.
- Silvia Ferioli, Susanna Zierler, Joanna Zaißerer, Johann Schredelseker, Thomas Gudermann, and Vladimir Chubanov, TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg²⁺ and Mg-ATP. Published online 2017 Aug 18. doi: 10.1038/s41598-017-08144-1 PMID:28821869
- Skandalis, C. Gialeli, N. Afratis, A.J. Aletras, T. Tsegenidis, A.D. Theocharis, N.K. Karamanos, Pharmacological targeting of proteoglycans and metalloproteinases: an emerging aspect in cancer treatment, in: N.K. Karamanos (Ed.), *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston 2012, pp. 785–801.
- Sleeman, J.P., G. Christofori, R. Fodde, J.G. Collard, G. Berx, C. Decraene, and C. Rugg. 2012. Concepts of metastasis in flux: the stromal progression model. *Semin Cancer Biol.* 22:174-186.
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* 1994 Nov 25;266(5189):1376-80.
- Soldani, C. & A. I. Scovassi (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update." *Apoptosis* 7(4): 321-328.
- Song, Yeonju Bae, JinJoo Jun, Hyomin Lee, NamDoo Kim, Kyung-Bok Lee, Wooyoung Hur, Jae-Yong Park, Taebo Sim. Identification of TG100-115 as a new and potent TRPM7 kinase inhibitor, which suppresses breast cancer cell migration and invasion, *Biochimica et Biophysica Acta* 1861 (2017) 947–957 PMID:28161478
- Spaeth EL, Labaff AM, Toole BP, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73:5347–59.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685–711.

- Storck H, Hild B, Schimmelpfennig S, Sargin S, Nielsen N, Zaccagnino A, Budde T, Novak I, Kalthoff H, Schwab A. Ion channels in control of pancreatic stellate cell migration. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):769-784. doi: 10.18632/oncotarget.13647.PMID:27903970
- Stuiver M, Lainez S, Will C, Terry S, Gunzel D, Debaix H, Sommer K, Kopplin K, Thumfart J, Kampik NB, Querfeld U, Willnow TE, Nemeč V, Wagner CA, Hoenderop JG, Devuyst O, Knoers NV, Bindels RJ, Meij IC, Muller D. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am J Hum Genet* 88: 333–343, 2011.
- Su LT, Liu W, Chen HC, González-Pagán O, Habas R, Runnels LW. TRPM7 regulates polarized cell movements. *Biochem J*. 2011 Mar 15;434(3):513-21. doi: 10.1042/BJ20101678.PMID:21208190
- Su, L.T.; Chen, H.C.; Gonzalez-Pagan, O.; Overton, J.D.; Xie, J.; Yue, L.; Runnels, L.W. TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase. *J. Mol. Biol.* 2010,396, 858–869.
- Sun, Y.; Sukumaran, P.; Varma, A.; Derry, S.; Sahnoun, A.E.; Singh, B.B. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim. Biophys. Acta*
- Swee M. H., Parks W. C., Pierce R. A. (1995). Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J. Biol. Chem.* 270 14899–14906. 10.1074/jbc.270.25.14899
- Tahara, H., K. Sato, Y. Yamazaki, T. Ohyama, N. Horiguchi, H. Hashizume, S. Kakizaki, H. Takagi, I. Ozaki, H. Arai, J. Hirato, R. Jesenofsky, A. Masamune, and M. Mori.. Transforming growth factor- α activates pancreatic stellate cells and may be involved in matrix metalloproteinase-1 upregulation 2013. *Lab Invest*. 93:720-732.
- Tajima S. Modulation of elastin expression and cell proliferation in vascular smooth muscle cells in vitro. *Keio J Med*. 1996 Mar;45(1):58-62. Review.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:227–31.
- Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y. Can magnesium act as a second messenger? Current data on translocation induced by various biologically active substances. *Magnesium Res* 13: 139–146, 2000.
- Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A, Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20 ;101 (16) : 6009-14. Epub 2004 Apr 6 PMID : 15069188
- Tang, D., D. Wang, Z. Yuan, X. Xue, Y. Zhang, Y. An, J. Chen, M. Tu, Z. Lu, J. Wei, K. Jiang, and Y. Miao. Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 132:993-1003.
- Tani D, Monteilh-Zoller MK, Fleig A, Penner R. Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNuM (TRPM7) currents. *Cell Calcium*. 2007 Mar;41(3):249-60. Epub 2006 Oct 24.PMID:17064762
- Tani D, Monteilh-Zoller MK, Fleig A, Penner R. Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNuM (TRPM7) currents. *Cell Calcium* 2007; 41: 249-60.
- Tasaki K, Shintani Y, Saotome T, Andoh A, Fujiyama Y, Hozawa S, et al. Pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Pancreatology*. 2003;3:414–21.

- Taylor JS, Vigneron DB, Murphy-Boesch J, Nelson SJ, Kessler HB, Coia L, Curran W, Brown TR. Free magnesium levels in normal human brain and brain tumors: ³¹P chemical-shift imaging measurements at 1.5 T. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6810–6814, 1991.
- Terasaki M, Rubin H. Evidence that intracellular magnesium is present in cells at a regulatory concentration for protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7324–7326, 1985.
- TerHaar, E., Coll, J. T., Austen, D. A., Hsiao, H. M., Swenson, L. and Jain, J. (2001). Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat. Struct. Biol.* 8, 593-596.
- Teyssier, F., J. Bay, C. Dionet & P. Verrelle (1999). "Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation." *Bull Cancer* 86(4): 345-357.
- Thakar RG, Chown MG, Patel A, Peng L, Kumar S, Desai TA. Contractility-dependent modulation of cell proliferation and adhesion by microscale topographical cues. *Small*. 2008 Sep;4(9):1416-24. doi: 10.1002/smll.200701302. PMID: 18711756
- Thebault S, Alexander RT, Tiel Groenestege WM, Hoenderop JG, Bindels RJ. EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J Am Soc Nephrol* 20: 78–85, 2009.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Feb 1;97:4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26562801
- Theocharis, C. Gialeli, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, Extracellular matrix: a functional scaffold, in: N.K. Karamanos (Ed.), *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston 2012, pp. 3–20.
- Tian, S.L.; Jiang, H.; Zeng, Y.; Li, L.L.; Shi, J. NGF-induced reduction of an outward-rectifying TRPM7-like current in rat CA1 hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 2007, 419, 93–98.
- Tinevez, J.-Y. et al. Role of cortical tension in bleb growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 18581–18586 (2009).
- Tokimitsu, I., Kato, H. and Tajima, S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1207, 68 73
- Tokimitsu, I., Tajima, S. and Nishikawa, S. (1990) *Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 168, 850-856.
- Tolstonog GV, Sabasch M & Traub P (2002). Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function. *DNA and Cell Biology*, 21: 213-239.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling..*Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.
- Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289–312.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Angiotensin II and vasopressin modulate intracellular free magnesium in vascular smooth muscle cells through Na⁺-dependent protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1996; 271: 24353-8.
- Touyz RM, Yao G. Modulation of vascular smooth muscle cell growth by magnesium-role of mitogen activated protein kinases. *J Cell Physiol* 2003; 197: 326-35.
- Tsujimoto, Y. Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. 1997 *Cell Death Differ.* 4(6): 429-434.
- Tukiendorf A, Rybak Z. New data on ecological analysis of possible relationship between magnesium in drinking water and liver cancer. *Magnes Res* 2004; 17: 46-52.
- Uitto J., Christiano A. M., Kahari V. M., Bashir M. M., Rosenbloom J. (1991). Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem. Soc. Trans.* 19 824–829. 10.1042/bst0190824
- Van den Brandt PA, Smits KM, Goldbohm RA, Weijnenberg MP. Magnesium intake and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 96: 510–513, 2007.

- Van Westerloo DJ, Florquin S, de Boer AM, Daalhuisen J, de Vos AF, Bruno MJ, et al. Therapeutic effects of troglitazone in experimental chronic pancreatitis in mice. *Am J Pathol.* 2005;166:721–8.
- VanAcker, G.J., Saluja, A.K., Bhagat, L., Singh, V.P., Song, A.M., and Steer, M.L. (2002). Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces Pancreatitis severity. *Am.J.Physiol.Gastrointest.LiverPhysiol.* 283, G794–G800. doi: 10.1152/ajpgi.00363.2001
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, E. K. Williamson, P. T. Schumacker & C. B. Thompson (1997). "Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria." *Cell* 91(5): 627-637
- Vanhaesebroeck, B. & M. D. Waterfield (1999). "Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases." *Experimental Cell Research* 253(1): 239-254.
- Vaquero, E.C., M. Edderkaoui, K.J. Nam, I. Gukovsky, S.J. Pandol, and A.S. Gukovskaya.. Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways. 2003 *Gastroenterology.* 125:1188-1202.
- Varna, M., G. Bousquet, L.-F. Plassa, #231, ois, P. Bertheau & A. Janin (2011). "TP53 Status and Response to Treatment in Breast Cancers." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 9
- Vassilev LT1, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004 Feb 6;303(5659):844-8. Epub 2004 Jan 2.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson & D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins." *Cell* 102(1): 43-53.
- Vincent, A., Herman ,J. ,Schulick ,R. , Hruban , R.H. , and Goggins ,M. Pancreatic cancer. 2011. *Lancet* 378, 607–620. doi:10.1016/S0140-6736(10)62307-0
- Virchow. *The Pathology of Miners' Lung.* *Edinb Med J.* 1858 Sep;4(3):204-213. No abstract available. PMID: 29646619
- Visser D, Middelbeek J, van Leeuwen FN, Jalink K. Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease. *Eur J Cell Biol.* 2014 Oct;93(10-12):455-65. doi: 10.1016/j.ejcb.2014.07.001. Epub 2014 Jul 8. PMID:25073440
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* 279: 19–25, 2004.
- VonAhrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A, The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol.* 2017 Mar 28;10(1):76. doi: 10.1186/s13045-017-0448-5. PMID: 28351381
- Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008a Apr 1;68(7):2085-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2477. PMID:18381413
- Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res.* 2008b Oct 1;68(19):7707-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1132. Review. PMID:18829522
- Vousden, K. H. & C. Prives (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." *Cell* 137(3): 413-431.
- Vousden, K. H. & D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 275-283.

- Wachi H, SY, Yamashita S, Suganami H, Uemura Y, Okamoto K, Yamada H, Tajima S. Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1995 Jul 17;368(2):215-9.
- Wachi H, SY, Yamashita S, Suganami H, Uemura Y, Okamoto K, Yamada H, Tajima S. Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1995 Jul 17;368(2):215-9.
- Wake K, "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. 1971 *Am J Anat* 132:429–462
- Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. 2011. p27: A barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res* 17: 12–18.
- Wang CY, Shi JD, Yang P, Kumar PG, Li QZ, Run QG, Su YC, Scott HS, Kao KJ, She JX. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene* 306: 37–44, 2003.
- Wang J, Xiao L, Luo CH, Zhou H, Hu J, Tang YX, Fang KN, Zhang Y. Overexpression of TRPM7 is associated with poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(9):3955-8. PMID: 24935580
- Wang X, Proud CG. Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol* 19: 260–267, 2009.
- Wang,W.M.; Zhao, Z.L.; Ma, S.R.; Yu, G.T.; Liu, B.; Zhang, L.; Zhang,W.F.; Kulkarni, A.B.; Sun, Z.J.; Zhao, Y.F. Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1alpha and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2015, 10, e0119723.
- Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiya Y, Taguchi M, Tashiro M, et al. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287:G1175–81.
- Watari, N., Y. Hotta, and Y. Mabuchi.. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. 1982 *Okajimas folia anatomica Japonica.* 58:837-858.
- Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS (June 2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99 (12): 7951–5.
- Weber G, Lea MA, Convery HJ, Stamm NB. Regulation of gluconeogenesis and glycolysis: studies of mechanisms controlling enzyme activity. *Adv Enzyme Regul* 5: 257–300, 1967.
- Weber JD, Gutmann DH. Deconvoluting mTOR biology. *Cell Cycle* 11: 236–248, 2012.
- Wehr, A.Y., E.E. Furth, V. Sangar, I.A. Blair, and K.H. Yu.. Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome. 2011 *Pancreas.* 40:557-566.
- Weinberg RA. The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem Sci.* 1990 May;15(5):199-202. Review.
- Werb, Z., et al., Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol*, 1982. 79 Suppl 1: p. 154s-159s. PMID: 7045242
- Werfel, J., S. Krause, A.G. Bischof, R.J. Mannix, H. Tobin, Y. Bar-Yam, R.M. Bellin, and D.E. Ingber.. How changes in extracellular matrix mechanics and gene expression variability might combine to drive cancer progression. 2013 *PloS one.* 8:e76122.
- Westhof E, Sundaralingam M. Restrained refinement of the monoclinic form of yeast phenylalanine transfer RNA. Temperature factors and dynamics, coordinated waters, and base-pair propeller twist angles. *Biochemistry* 25: 4868–4878, 1986
- Whitcomb ,D.C. (2011). Genetics and alcohol : a lethal combination in pancreatic disease? *Alcohol .Clin.Exp.Res.* 35, 838 842.doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01409.x

- Whitcomb D, Greer J. Germ-line mutations, pancreatic inflammation, and pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov;7(11 Suppl):S29-34. doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.032. Review. PMID: 19896094
- Whitcomb DC. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004a Aug;287(2):G315-9. Review. PMID: 15246966
- Whitcomb DC. Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004b Nov;1(1):46-52. Review. PMID: 16265044
- Whitcomb, D.C.(2012).Genetics of alcoholic and non alcoholic pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 28, 501 506. Doi :10.109 7/ MOG .0b013e328356e7f3
- Whitcomb,D.C., Gorry,M.C., Preston,R.A.,Furey,W., Sossenheimer,M.J., Ulrich,C.D.,et al.(1996).Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat.Genet*. 14, 141–145.doi:10.1038/ ng1096-141
- Whittle MC, Hingorani SR, Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Mechanisms and Therapeutic Targets, *Gastroenterology* 2019;156:2085–2096
- Widmann, C., P. Gerwins, N. L. Johnson, M. B. Jarpe & G. L. Johnson (1998). "MEK Kinase 1, a Substrate for DEVD-Directed Caspases, Is Involved in Genotoxin-Induced Apoptosis." *Molecular and Cellular Biology* 18(4): 2416-2429.
- Willis S, Villalobos VM, Gevaert O, Abramovitz M, Williams C, Sikic BI, Leyland-Jones B, Single Gene Prognostic Biomarkers in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. 2016 Feb 17;11(2):e0149183. doi: 10.1371/journal.pone.0149183.
- Wolf F, Cittadini A R.M., Maier J A.M. Magnesium and tumors: Ally or foe? 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.ctrv.2009.01.003
- Wolf FI, Cittadini A. Magnesium in cell proliferation and differentiation. *Front Biosci* 1999; 4: d607-d617.
- Wolf FI, Di Francesco A, Covacci V, Cittadini A. Regulation of magnesium efflux from rat spleen lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344: 397-403.
- Wolf FI, Fasanella S, Tedesco B, Torsello A, Sgambato A, Faraglia B, Palozza P, Boninsegna A, Cittadini A. Regulation of magnesium content during proliferation of mammary epithelial cells (HC-11). *Front Biosci* 2004; 9: 2056-62.
- Wolf FI, Trapani V, Simonacci M, Boninsegna A, Mazur A, Maier JAM. Magnesium deficiency affects mammary epithelial cell proliferation: Involvement of oxidative stress. *Nutr Cancer* 2008;
- Wong ST, Baker LP, Trinh K, Hetman M, Suzuki LA, Storm DR, Bornfeldt KE. Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E(2)-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001 Sep 7;276(36):34206-12. Epub 2001 Jun 29. PMID: 11432866
- Wong, R.; Turlova, E.; Feng, Z.P.; Rutka, J.T.; Sun, H.S. Activation of TRPM7 by naltriben enhances migration and invasion of glioblastoma cells. *Oncotarget* 2017, 8, 11239–11248.
- Woolner S., L.L. O'Brien, C. Wiese, W.M. Bement Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function *Journal of Cell Biology*, 182 (1) (2008), pp. 77-88
- Wormann, S.M., K.N. Diakopoulos, M. Lesina, and H. Algul. 2014. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene*. 33:2956-2967.
- Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):381-404. doi: 10.1124/pr.110.002725. PMID: 20716668

- Wu M, Arimura GK, Yunis AA, Purification and characterization of a plasminogen activator secreted by cultured human pancreatic carcinoma cells. *Biochemistry*. 1977 May 3;16(9):1908-13, PMID: 15590
- Xiao E, Yang HQ, Gan YH, Duan DH, He LH, Guo Y, Wang SQ, Zhang Y. Brief reports: TRPM7 Senses mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2015 Feb;33(2):615-21.doi: 10.1002/stem.1858. PMID:25263397
- Xing J, Wang M, Hong J, Gao Y, Liu Y, Gu H, Dong J, Li L. TRPM7 channel inhibition exacerbates pulmonary arterial hypertension through MEK/ERK pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019 Jun 19;11(12):4050-4065. doi: 10.18632/aging.102036. PMID : 31219801
- Xiong Y, Hannon G, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993.p21 is a universal inhibitor of the cyclin kinases. *Nature* 366: 701–704.
- Xiong Y, McDonald LT, Russell DL, Kelly RR, Wilson KR, Mehrotra M, Soloff AC, LaRue AC. Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment. *World J Stem Cells*. 2015;7:253–65.
- Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 28;20(32):11216-29. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11216. Review. PMID : 25170206
- Xu, Z., A. Vonlaufen, P.A. Phillips, E. Fiala-Beer, X. Zhang, L. Yang, A.V. Biankin, D. Goldstein, R.C. Pirola, J.S. Wilson, and M.V. Apte. 2010. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *The American journal of pathology*. 177:2585-2596.
- Yadav A, Kumar B, Yu J-G, Old M, Teknos TN, Kumar P. Tumor-associated endothelial cells promote tumor metastasis by chaperoning circulating tumor cells and protecting them from anoikis. *PLoS One*. 2015;10:e0141602.
- Yadav,D.,and Lowenfels, A.B.The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. 2013. *Gastroenterology* 144, 1252–1261.doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068
- Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell*. 2001 May;7(5):1047-57. PMID: 1138985
- Yamakawa T, Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Yamakawa Y, Motley ED, et al. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells.*Hypertension*. 2000;35:313–8.
- Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, Miki H. Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet* 9: e1003983, 2013.
- Yan Y, Tian J, Mo X, Zhao G, Yin X, Pu J, Zhang B. Genetic variants in the RAB7L1 and SLC41A1 genes of the PARK16 locus in Chinese Parkinson's disease patients. *Int J Neurosci* 121: 632–636, 2011.
- Yang CY, Chiu HF, Tsai SS, Wu TN, Chang CC. Calcium and magnesium in drinking water and the risk of death from esophageal cancer. *Magnes Res*2002; 15: 215-22.
- Yang K, Y Guo, W C Stacey, J Harwalkar, J Fretthold, M Hitomi, D W Stacey Glycogen synthase kinase 3 has a limited role in cell cycle regulation of cyclin D1 levels. *BMC Cell Biol*. 2006; 7: 33. Published online 2006 Aug 30. doi: 10.1186/1471-2121-7-33 PMCID: PMC1592484
- Yang L, Arora K, Beard WA, Wilson SH, Schlick T. Critical role of magnesium ions in DNA polymerase beta's closing and active site assembly. *J Am Chem Soc* 126: 8441–8453, 2004.
- Yang M, Fang J, Liu Q, Wang Y, Zhang Z. Role of ROS-TRPM7-ERK1/2 axis in high concentration glucose-mediated proliferation and phenotype switching of rat aortic vascular smooth muscle cells.

- Biochem Biophys Res Commun. 2017 Dec 16;494(3-4):526-533. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.122. Epub 2017 Oct 25 PMID:29079194
- Yang M, Fang J, Liu Q, Wang Y, Zhang Z. Role of ROS-TRPM7-ERK1/2 axis in high concentration glucose-mediated proliferation and phenotype switching of rat aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Dec 16;494(3-4):526-533. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.122. Epub 2017 Oct 25 PMID:29079194
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T.-I. Peng, D. P. Jones & X. Wang (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 275(5303): 1129-1132.
- Yang, Y., S. Karakhanova, J. Werner, and A.V. Bazhin. 2013. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Current medicinal chemistry.* 20:3677-3692.
- Yang, Y., S. Karakhanova, J. Werner, and A.V. Bazhin. 2013. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Current medicinal chemistry.* 20:3677-3692.
- Yannas IV. Tissue and organ regeneration in adults. New York: Springer; 2001. pp. 244–277.
- Yannas IV. Tissue and organ regeneration in adults. New York: Springer; 2001. pp. 244–277.
- Yee NS, Kazi AA, Yee RK. Cellular and Developmental Biology of TRPM7 Channel-Kinase: Implicated Roles in Cancer. *Cells.* 2014 Jul 30;3(3):751-77. doi: 10.3390/cells3030751. PMID:25079291
- Yee NS, Zhou W, Liang IC. Transient receptor potential ion channel Trpm7 regulates exocrine pancreatic epithelial proliferation by Mg²⁺-sensitive Socs3a signaling in development and cancer. *Disease Models Mechanisms* 4: 240–254, 2011.
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., and Goto, M. (2008). Precursor lesions of Pancreatic cancer. *Gut Liver* 2, 137–154. Doi :10. 5009 / gnl. 2008.2.3.137
- Yoshida S, Yokota T, Ujiki M, Ding XZ, Pelham C, Adrian TE, et al. Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323:1241–5.
- Yoshida, S., M. Ujiki, X.Z. Ding, C. Pelham, M.S. Talamonti, R.H. Bell, Jr., W. Denham, and T.E. Adrian.. Pancreatic stellate cells (PSCs) express cyclooxygenase-2 (COX-2) and pancreatic cancer stimulates COX-2 in PSCs. 2005 *Mol Cancer.* 4:27.
- Yu J, Du W, Wan F, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J, Ren X. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol.* 2013;190:3783–97
- Yu Z, Lin J, Xiao Y, Han J, Zhang X, et al. (2005) Induction of cell-cycle arrest by all-trans retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal (MEPM) cells. *Toxicol Sci* 83: 349–354.
- Yu, J.H., and H. Kim.. Oxidative stress and cytokines in the pathogenesis of pancreatic cancer. 2014 *Journal of cancer prevention.* 19:97-102.
- Zamzami, N., S. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gómez-Monterrey, M. Castedo & G. Kroemer (1996). "Mitochondrial control of nuclear apoptosis." *The Journal of Experimental Medicine* 183(4): 1533-1544.
- Zeng, Z.; Leng, T.; Feng, X.; Sun, H.; Inoue, K.; Zhu, L.; Xiong, Z.G. Silencing TRPM7 in mouse cortical astrocytes impairs cell proliferation and migration via ERK and JNK signaling pathways. *PLoS ONE* 2015, 10, e0119912. signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 2017, 16, 5699–5705.
- Zhang LP, Ma F, Abshire SM, Westlund KN. Prolonged high fat/alcohol exposure increases TRPV4 and its functional responses in pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013 May 1;304(9):R702-11. doi: 10.1152/ajpregu.00296.2012. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23447134

- Zhang Z, Yu H, Huang J, Faouzi M, Schmitz C, Penner R, Fleig A. The TRPM6 kinase domain determines the MgATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. *J Biol Chem* 289: 5217–5227, 2014.
- Zhang, K.; Zhang, Y.; Feng, W.; Chen, R.; Chen, J.; Touyz, R.M.; Wang, J.; Huang, H. Interleukin-18 Enhances Vascular Calcification and Osteogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells Through TRPM7 Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017, 37, 1933–1943.
- Zhang, Z.; Wang, M.; Fan, X.H.; Chen, J.H.; Guan, Y.Y.; Tang, Y.B. Upregulation of TRPM7 channels by angiotensin II triggers phenotypic switching of vascular smooth muscle cells of ascending aorta. *Circ. Res.* 2012, 111, 1137-1146.
- Zhao LY, Li J, Huang XQ, Wang GH, Lv XF, Meng WF, Chen WL, Pang JY, Lin YC, Sun HS, Wang GL, Du YM. Xyloketal B exerts antihypertensive effect in renovascular hypertensive rats via the NO-sGC-cGMP pathway and calcium signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 May;39(5):875-884. doi: 10.1038/aps.2018.12. Epub 2018 Mar 29. PMID:29595193
- Zhao Y, Wang J, Jiang H, Yu Z, Li X, Shi J. Following OGD/R, annexin 1 nuclear translocation and subsequent induction of apoptosis in neurons are assisted by myosin IIA in a TRPM7 kinase-dependent manner. *Mol Neurobiol.* 2015 Apr;51(2):729-42. doi: 10.1007/s12035-014-8781-y. Epub 2014 Jun 18. PMID:24939696
- Zhao, L. & P. K. Vogt (2008). "Class I PI3K in oncogenic cellular transformation." *Oncogene* 27(41): 5486-5496.
- Zheng, Q Yang, L Xie, Z Qiu, Y Huang, Y Lin, L Tu, C Cui Overexpression of MAGT1 is associated with aggressiveness and poor prognosis of colorectal cancer *Oncol Lett.* 2019 Oct; 18(4): 3857–3862. Published online 2019 Aug 5. doi: 10.3892/ol.2019.10710
- Zhou H, Clapham DE. Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15750–15755, 2009.
- Zhou, J., J. Ahn, S. H. Wilson & C. Prives (2001). "A role for p53 in base excision repair." *The EMBO Journal* 20(4): 914-923.
- Zhou, X Liu, N Huang, Y Chen. Magnesium ion leachables induce a conversion of contractile vascular smooth muscle cells to an inflammatory phenotype, 2018, Published online 00 Month 2018 in Wiley Online Library
- Zierler S, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Pörzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A. Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *J Biol Chem.* 2011 Nov 11;286(45):39328-35. doi: 10.1074/jbc.M111.264341. Epub 2011 Sep 16. PMID:21926172
- Zou ZG, Rios FJ, Montezano AC, Touyz RM TRPM7, Magnesium, and Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 16;20(8). pii: E1877. doi: 10.3390/ijms20081877. Review. PMID: 30995736
- Zsurka G, Gregan J, Schweyen RJ. The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. *Genomics* 72: 158–168, 2001.
- Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997 Feb 15;89(4):1121-32. Review. No abstract available. PMID: 9028933

Valorisation :

Articles:

Ion Channels: New Actors Playing in Chemotherapeutic Resistance.

KISCHEL P, GIRAULT A, RODAT-DESPOIX L, CHAMLALI M, RADOSLAVOVA S, ABOU DAYA H, LEFEBVRE T, FOULON A, RYBARCZYK P, HAGUE F, DHENNIN-DUTHILLE I, GAUTIER M, OUADID-AHIDOUCH H
Cancers (Publié)

TRPM7/RPSA complex regulates pancreatic cancer cell migration

T LEFEBVRE, R COUSIN, S BRASSART-PASCO, I DHENNIN-DUTHILLE, H OUADID-AHIDOUCH, B BRASSART, M GAUTIER
Frontiers in Oncology (Soumis)

Cadmium exposure increases TRPM7 expression in epithelial cells leading to enhanced cell migration and invasion.

A VANLEYS, G FOUQUET, S PASCO-BRASSART, B BRASSART, T LEFEBVRE, P RYBARCZYK, P KISCHEL, F HAGUE, I DHENNIN-DUTHILLE, H OUADID-AHIDOUCH, and M GAUTIER
Archives of Toxicology (Soumis)

Communications Orales:

Regulation of constitutive cation entry and proliferation by TRPM7 channels in human pancreatic stellate cells

T LEFEBVRE, A VANLAEYS, S RADOSLAVOVA, H OUADID-AHIDOUCH, I DHENNIN-DUTHILLE, M. GAUTIER
Europhysiology 2018, Londres UK
Communication orale

Implication du canal TRPM7 dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules stellaires pancréatiques activées

T LEFEBVRE, A VANLAEYS, S RADOSLAVOVA, H OUADID-AHIDOUCH, I DHENNIN-DUTHILLE, M. GAUTIER
Journée Amiénoise de Recherche en Santé 2017
Communication orale

Communications Affichées:

Le canal TRPM7 régule la prolifération, la migration et l'invasion des cellules stellaires pancréatiques.

T LEFEBVRE, A VANLAEYS, H OUADID-AHIDOUCH, I DHENNIN-DUTHILLE, M. GAUTIER
Journée de l'Association Française de la Recherche sur le Cancer du Pancréas 2017, Lille et Conférence Journée Canaux ioniques 2017, Amiens
Communication affichée

Rôle du canal TRPM7 dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses pancréatiques par les peptides d'élastine

T LEFEBVRE, A VANLAEYS, H OUADID-AHIDOUCH, I DHENNIN-DUTHILLE, B BRASSART, M. GAUTIER

Journée Jeunes Chercheurs 2017, Reims et Journées du Cancéropôle Nord-Ouest ,2017, Deauville

Communication affichée

Regulation of Human Activated Pancreatic Stellate Cells proliferation by TRPM7 channels

T LEFEBVRE, S RADOSLAVOVA, H OUADID-AHIDOUCH, I DHENNIN-DUTHILLE, M. GAUTIER

Physiologie 2019, Aberdeen UK

Communication affichée

Résumé :

L'expression et/ou l'activation des canaux ioniques, protéines transmembranaires qui contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires, sont altérées dans le cancer. Nous avons déjà montré l'implication des canaux TRPM7 dans la migration et l'invasion des cellules d'ACP. Par contre, son expression et son rôle dans les cellules stellaires pancréatiques sont inconnus. Au cours de ce travail nous avons démontré que le canal TRPM7 est impliqué dans la prolifération et le maintien de l'homéostasie magnésique dans les CSP. Le canal régule la prolifération cellulaire par l'activation magnésium dépendante de la voie PI3K/AKT permettant la répression de P53 et GSK3, la synthèse de CDK2 et PCNA, et la transition G1-S du cycle cellulaire. Nous avons également démontré que le canal TRPM7 régule l'expression de l' α -SMA, principal marqueur d'activation des CSP, en modulant l'activation de la voie ERK de façon dépendante du magnésium. Enfin nos résultats indiquent que l'expression du canal TRPM7 varie en fonction du niveau d'activation des CSP. L'ensemble de nos résultats suggèrent que le canal TRPM7 pourrait constituer un biomarqueurs important concernant l'activation et la prolifération des CSP.

Mots clés : TRPM7, ACP, CSP, prolifération cellulaire, magnésium, canaux ioniques, P53.

Abstract :

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is one of the deadliest cancers with a 5 years survival rate under 5%. PDAC development and aggressiveness involve pancreatic stellate cells (PSC) activation occurring during desmoplasia. PSC activation induces α -SMA expression, increases proliferative capacities of the CSP, and leads to cancer growth and metastasis. Ion channels are involved in many cellular mechanisms including cell migration, invasion and proliferation. We previously described the role of TRPM7 in PDAC cell invasion and migration but its role in PSC remains unknown. Here we show that TRPM7 is involved in magnesium homeostasis and PSC cell proliferation through PI3K/AKT pathway activation by magnesium. TRPM7 mediated magnesium entry inducing PI3K/AKT pathway activation and leading to P53 and GSK3 inhibition, and CDK2 and PCNA upregulation inducing G1 to S transition. Our results show that TRPM7 is also involved in α -SMA expression by regulating ERK activation in a magnesium dependent manner. PSC activation also regulates TRPM7 expression. Taking together our results show TRPM7 as a potential biomarker for CSP activation and proliferation in PDAC.

Key words : PDAC, TRPM7, PSC, cell proliferation, magnesium, ion channels, P53