



HAL
open science

Implication du canal TRPM7 dans les mécanismes métastatiques de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Alison Vanlaeys

► **To cite this version:**

Alison Vanlaeys. Implication du canal TRPM7 dans les mécanismes métastatiques de l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0018 . tel-03691947

HAL Id: tel-03691947

<https://theses.hal.science/tel-03691947v1>

Submitted on 9 Jun 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.



THESE 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

Alison VANLAEYS

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

**Implication du canal TRPM7 dans les mécanismes
*métastatiques de l'adénocarcinome canalaire pancréatique***

Soutenue le 4 décembre 2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. N. JONCKHEERE, Chargé de Recherche Inserm -HDR, Université de Lille 2	Rapporteur
M. C. VANDIER, Professeur des Universités, Université de Tours	Rapporteur
M^{me} H. OUADID-AHIDOUCH, Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne	Examineur
M^{me} V. TRAPANI, Chercheur, Université Catholique du Sacré-Cœur de Rome	Examineur
M. B. BRASSART, Maître de Conférences-HDR, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examineur
M. D. CHATELAIN, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Picardie Jules Verne	Examineur
M. M. GAUTIER, Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à tous les membres du jury pour avoir accepté de juger cette thèse : à mes rapporteurs le Professeur **Christophe VANDIER** et le Docteur **Nicolas JONCKHEERE** et mes examinateurs, le professeur **Halima OUADID-AHIDOUCH**, le docteur **Valentina TRAPANI**, le docteur **Bertrand BRASSART** et le professeur **Denis CHATELAIN**. Merci pour votre temps et votre déplacement en provenance de destination plus ou moins lointaine pour assister à ma soutenance. Je souhaite, humblement, que la lecture du manuscrit et la participation dans ce jury de soutenance vous ont intéressé et apporté de nouvelles connaissances sur le cancer du pancréas, l'invasion et le canal TRPM7. Je vous remercie par avance pour votre analyse critique qui ont permis d'améliorer ce travail et pour nos échanges à l'issue de la présentation de mes travaux.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, le docteur **Bertrand BRASSART** et le professeur **Halima OUADID-AHIDOUCH**, pour l'attention portée sur mes travaux durant ces trois années de thèse et sur toutes les critiques positives et leurs conseils d'expert qui ont permis d'enrichir ces travaux et d'affiner mes compétences d'analyse et de réflexion.

Je renouvelle mes remerciements au professeur **Halima OUADID-AHIDOUCH**, directrice du LPCM, pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse dans son laboratoire et de m'avoir accordée sa confiance pour pouvoir réaliser des communications lors de congrès scientifiques et auprès du grand public afin de valoriser ces travaux et pour pouvoir les faire connaître aux étudiants.

J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur **Mathieu GAUTIER**, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il a su m'accorder en me choisissant parmi tout les candidats potentiels. Merci pour ton encadrement qui m'a beaucoup apportée professionnellement et humainement. Merci pour tes conseils et ton professionnalisme dont tu as fait preuve en organisant des réunions afin de suivre régulièrement l'avancement des résultats et de me remettre dans le droit chemin scientifique. Je t'exprime ma gratitude pour avoir été un moteur dans les partenariats entre le LPCM et d'autres laboratoires et m'avoir permis d'y participer et de me déplacer chez nos collaborateurs à Lille et Reims. Merci de m'avoir permis de valoriser mes résultats par des publications et des communications scientifiques.

Je tiens à remercier de manière générale **tout les membres statutaires du LPCM** pour leur accueil, leurs sourires, leurs conseils et leur esprit critique au cours des réunions de laboratoire qui m'ont permis de développer la rigueur scientifique et la capacité à argumenter et justifier mes travaux de recherche.

J'adresse de chaleureux remerciements au Docteur **Isabelle DHENNIN-DUTHILLE** pour sa disponibilité, les formations qu'elle m'a dispensées et les précieux conseils concernant la biochimie et la biologie moléculaire. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi en dehors de la recherche fondamentale lors de mes deux années où j'ai été chargée d'enseignement. Merci de m'avoir rassurée lors de mon baptême de l'air et de m'avoir accompagnée lors de mon premier congrès où j'ai pu me rendre compte des avantages de communiquer sur ses travaux à l'international.

J'exprime toute ma gratitude au docteur **Frédéric HAGUE** pour son humour décapant au risque de devenir corrosif. C'est un réel plaisir de discuter avec toi avec cette amplitude de sujets différents plus ou moins sérieux. Merci pour ton expertise en imagerie et pour ta disponibilité pour répondre à mes questions existentielles.

Pour ces compétences indéniables en informatique (merci pour le double écran, cela m'a été très utile et la réparation catastrophe de mon ordinateur) et un esprit de remise en cause qui permet de susciter le débat, je remercie le docteur **Philippe KISCHEL**.

Pour cette joie de vivre intarissable et ses judicieux conseils, je remercie le docteur **Lise RODAT-DESPOIX**.

Je remercie **Marie-Sophie TELLIEZ** pour sa bonne humeur constante, sa gentillesse et son aide notamment lorsque que j'étais chargée d'enseignement et pour mes premières commandes lorsque que j'avais la responsabilité de la culture cellulaire.

Mes remerciements vont ensuite à **tout les doctorants du LPCM** avec qui j'ai eu l'opportunité de m'enrichir par leurs expériences et leurs conseils et de travailler à leurs cotés pendant des périodes plus ou moins longues : les membres de l'équipe TRPM7 pour les nombreux fous rires dont ils ont été la cause (Thibaut et Silviya « ma binôme de sushi »), Hiba, Riadh, Mohamed, les docteurs Marianne, Jessy, Mehdi, Nahla et Alexia. Je n'oublie pas les **chercheurs postdoctoraux**, Marta, Michael et Alban auprès de qui j'ai pu affiner mes compétences techniques grâce à de nombreux conseils et qui ont pu me donner une vision concrète de la vie de chercheur après-thèse.

Je suis reconnaissante envers l'Association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas qui m'ont soutenue financièrement afin d'aller me former à la technologie novatrice CRISPR-Cas9 à Lille. Je remercie la directrice de l'équipe « Mucines, différenciation et cancérogénèse épithéliales » de l'UMR-S 1172, le professeur **Isabelle VAN-SEUNINGEN** de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie les membres du laboratoire (statutaires, doctorants, secrétaire) pour leur accueil et leur bonne humeur. Merci au docteur **Nicolas JONCKHEERE** et au duo de choc formé par les **docteurs Mouloud SOUIDI** et **Bernadette NEVE** ainsi que le docteur **Romain VASSEUR et Elisa**. Cela a été très agréable de pouvoir travailler et apprendre à vos côtés.

J'ai pu également profiter d'un autre partenariat avec l'équipe Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire de l'UMR CNRS 7369 à Reims. Merci à la Structure Fédérative de Recherche CAP-Santé qui m'a soutenue financièrement pour me former à la microscopie confocale et la zymographie. Mes remerciements vont tout d'abord au directeur du laboratoire le professeur **François-Xavier MAQUART** de m'avoir donnée l'opportunité de venir dans son équipe de recherche. Je tiens à remercier également les docteurs **Bertrand BRASSART** et **Sylvie BRASSART-PASCO** pour leur professionnalisme et leur bonne humeur. Enfin je tiens à remercier **Auréli Dupont-Desorgues** pour son implication dans le projet.

Je remercie les étudiants que j'ai encadrés au sein du LPCM et que j'ai supervisés au cours de mes missions de chargée d'enseignement ou rencontrés lors de communications grand public qui m'ont permises de développer ma capacité de communication et ma pédagogie.

Je remercie également les organismes financeurs de cette thèse, l'ancienne région Picardie devenue Hauts-de-France et le Fond Européen de Développement Régional.

Après avoir remercié les membres de mon entourage professionnel, je veux maintenant adresser de chaleureux remerciements à mon entourage personnel, à tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin dans ces trois ans de travail (mon parrain, **Pascal, les membres du parcours Alpha, mes beaux-parents, mes amis lillois, amiénois, caennais et parisiens**) ne serait-ce que pour un simple sourire, une oreille attentive, leurs questions envers mes recherches auxquelles j'ai beaucoup aimé répondre ou une parole réconfortante dans les moments plus difficiles. Merci à tous ceux qui ont pris le temps de venir assister à ma soutenance de thèse, cela me touche énormément. J'espère que mon discours aura suscité votre intérêt et que j'ai pu vous faire apprendre des choses sur le cancer du pancréas et la recherche fondamentale.

Merci à mon amour, **Jérémie**, pour ton soutien sans faille. Je suis heureuse que tu fasses partie de ma vie et que tu m'ais accompagnée au bout de ce travail. Merci d'avoir toujours cru en moi plus que moi-même afin de me pousser à donner le meilleur. Merci pour ta patience et d'avoir tenu la distance durant ces trois années. Merci pour nos fous rires et nos quarts d'heure si importants pour mon moral dans les moments difficiles. Je pourrais encore m'épancher de nombreuses lignes sur tout ce que tu m'as apporté au cours de ces sept années et qui font que j'en suis ici aujourd'hui. Je suis fière de ce travail et te le dédie, Je t'aime.

Enfin, je te dédie également ce travail à ma famille (Mes parents : **Papa, Marielle, Maman, Frédéric** et mes frères et sœurs : **Corentin, Maëlou, Charlotte et Enzo**). Merci pour votre éducation et votre amour inconditionnel qui font que j'en suis ici aujourd'hui. Je vous aime.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION.....	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
PARTIE 1 : LE PANCREAS, DE LA PHYSIOLOGIE A LA PATHOLOGIE.....	15
1. PHYSIOLOGIE DU PANCREAS	15
1.1. Anatomie	15
1.2. Fonction endocrine	15
1.3. Fonction exocrine	17
2. LE CANCER DU PANCREAS	19
2.1. Facteurs de risque	20
2.2. Les différents types de cancers du pancréas et symptômes.....	20
2.3. Diagnostic	22
2.4. Traitements	24
A. Traitement de l'ACP non-métastatique.....	24
B. Traitement de l'ACP métastatique	26
C. Nouvelles thérapies.....	27
2.5. La progression de l'ACP : des lésions précancéreuses jusqu'au stade métastatique	28
A. Etapes cellulaires	28
B. Bases moléculaires	29
PARTIE 2 : LA CASCADE METASTATIQUE	33
1. GENERALITES	33
2. THEORIES D'ACQUISITION DE LA CAPACITE METASTATIQUE	33
3. EVENEMENTS CELLULAIRES DE LA CASCADE METASTATIQUE	35
3.1. Les différents types de transition.....	36
3.2. Les étapes de formation des métastases	38
3.3. Un mécanisme clé : l'invasion cellulaire.....	39
A. Les protéases : effectrices de l'invasion cellulaire	39
B. La famille des métalloprotéases matricielles (MMPs)	40
a. Structure.....	42

b.	Régulation.....	44
C.	La protéine chaperonne Hsp90	48
a.	Structure.....	50
b.	Régulation.....	51
4.	DE NOUVEAUX ACTEURS DE L'INVASION CELLULAIRE : LES CANAUX IONIQUES.....	56
4.1.	Implication des modulations d'expression et d'activité des canaux ioniques	60
A.	Rôle des canaux potassiques activés par le Ca ²⁺ (SK)	60
B.	Rôle des canaux TRP (Transient Receptor Potential)	60
C.	Rôle des canaux SOC (Store Operated Channel)	62
D.	Rôle des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav).....	62
E.	Rôle d'autres canaux cationiques et des canaux chlorures	63
4.2.	Rôle du microenvironnement tumoral via les canaux ioniques.....	64
A.	Implication des cellules immunitaires associées à la tumeur	65
B.	Implication du microenvironnement hypoxique.....	65
C.	Implication du microenvironnement acide	65
4.3.	Description des signalisations impliquant les canaux ioniques	67
A.	Etude des interactions entre les partenaires protéiques et les canaux ioniques	67
B.	Description des voies de signalisation régulant l'invasion via les canaux ioniques	68
4.4.	Régulations transcriptionnelles des canaux ioniques	69
PARTIE 3 : LE CANAL TRPM7		71
1.	DECOUVERTE ET STRUCTURE	72
1.1.	Activité canalaire	73
1.2.	Activité kinase	74
2.	REGULATIONS.....	77
2.1.	Régulations physiologiques de l'activité canalaire.....	77
A.	Par les ions libres	77
B.	Par les ions couplés aux nucléotides	78
C.	Par le pH	78
D.	Autres régulations	79
E.	Régulations controversées	79
a.	Par les récepteurs couplés aux protéines G	79
b.	Par la kinase.....	79
2.2.	Régulations physiologiques de l'activité kinase	80

3.	MODULATION PHARMACOLOGIQUE	81
4.	ROLE EN PHYSIOLOGIE	83
4.1.	Développement embryonnaire / différenciation	84
4.2.	Mort / Survie cellulaire.....	85
4.3.	Prolifération.....	86
4.4.	Adhésion cellulaire	87
4.5.	Migration cellulaire	87
5.	ROLE EN PATHOLOGIE	88
5.1.	Prolifération.....	89
5.2.	Migration / Invasion	90
PARTIE 4 : PROJET DE THESE		92
1.	IMPLICATION DE TRPM7 DANS LES MECANISMES METASTATIQUES DE L'ACP	92
2.	IMPLICATION DE TRPM7 DANS UN AUTRE MODELE DE CELLULES INVASIVES STIMULEES PAR LE CD ²⁺	93
3.	OBJECTIF	96
MATERIELS ET METHODES.....		97
1.	CULTURE CELLULAIRE	98
1.1.	Modèles cellulaires et conditions de culture	98
1.2.	Passage des cellules.....	99
2.	EVALUATION DE LA VIABILITE PAR LE TEST MTT.....	99
3.	ETUDE DE LA MIGRATION ET DE L'INVASION CELLULAIRE EN CHAMBRE DE BOYDEN	100
4.	BIOLOGIE MOLECULAIRE	101
4.1.	Surexpression et extinction de l'expression de gènes	101
A.	Production des plasmides de surexpression de TRPM7.....	101
B.	Technique de l'ARN interférence et transfection cellulaire	102
4.2.	Extraction d'ARN et PCR	104
A.	Extraction des ARN totaux.....	104
B.	Transcription inverse (RT)	105
C.	PCR qualitative	105
D.	PCR quantitative (qPCR)	106
4.3.	Modification de gènes par la technique des ciseaux moléculaires CRISPR Cas9	108
A.	Principe de la technique et stratégie.....	108

B.	Design des outils moléculaires	111
a.	Bras homologues	111
b.	Single guide RNA.....	111
C.	Production des outils moléculaires	112
a.	Protocoles utilisés pour la production des plasmides.....	112
b.	Génération des outils	115
D.	Transfection des clones	116
E.	Sélection des cellules par la résistance à l'antibiotique.....	119
F.	Validation des clones.....	120
5.	IMAGERIE CELLULAIRE : ETUDE DES CONCENTRATIONS IONIQUES CYTOSOLIQUES.....	120
5.1.	Principe	120
5.2.	Dispositif expérimental d'imagerie	121
5.3.	Préparation des cellules et du milieu d'imagerie	121
5.4.	Etude de l'entrée cationique basale (Quenching au Mn^{2+}).....	122
5.5.	Evaluation du Ca^{2+} cytosolique	123
5.6.	Evaluation du Mg^{2+} cytosolique.....	123
6.	BIOCHIMIE : METHODES D'ANALYSE DES PROTEINES.....	124
6.1.	Western Blot.....	124
6.2.	Zymographie.....	127
6.3.	Immunoprécipitation	128
6.4.	Immunofluorescence.....	129
6.5.	Proximity Ligation Assay.....	130
6.6.	Utilisation du microscope à fluorescence	133
7.	ANALYSES STATISTIQUES.....	133
RESULTATS		134
1.	LE CANAL TRPM7 REGULE L'INVASION DES CELLULES D'ADENOCARCINOME CANALAIRE VIA LA VOIE IMPLIQUANT HSP90 ALPHA / UPA / MMP-2	135
1.1.	Résumé	135
1.2.	Article 1	138
2.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	139
2.1.	TRPM7 et Hsp90 α sont surexprimés dans les cellules d'ACP.....	140
2.2.	TRPM7 et Hsp90 α ne se régulent pas mutuellement au niveau protéique.....	141

2.3.	La kinase de TRPM7 est impliquée dans l'invasion des cellules d'ACP	142
2.4.	TRPM7 est impliqué dans l'acquisition du phénotype invasif dans les cellules non-cancéreuses pancréatiques	143
2.5.	Hsp90α module l'invasion des cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques	144
2.6.	TRPM7 et Hsp90α diminuent l'invasion en intervenant dans une même voie.....	145
2.7.	TRPM7 et Hsp90α interagissent ensemble au sein d'un même complexe protéique	146
2.8.	TRPM7 est impliqué dans la modification post-traductionnelle d'Hsp90α sur ses résidus sérines	148
2.9.	Rôle de la kinase dans la localisation du complexe TRPM7-Hsp90α.....	149
2.10.	Le Mg ²⁺ est impliqué dans la régulation de l'invasion via la voie impliquant TRPM7 et Hsp90α	150
2.11.	Validation de la stratégie d'inactivation du domaine kinase endogène de TRPM7 par CRISPR cas9	151
3.	TRPM7 REGULE L'INVASION DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES ET PANCREATIQUES NON-CANCEREUSES EXPOSEES AU CD ²⁺	152
3.1.	Résumé	152
3.2.	Article 2	155
4.	DECOUVERTES RECENTES SUR LES ROLES ONCOGENIQUES DU CANAL TRPM7.....	175
4.1.	Résumé	175
4.2.	Revue 1	176
DISCUSSION GENERALE		177
1.	BILAN	178
2.	IMPLICATION DU CANAL TRPM7 DANS L'INVASION BASALE DANS L'ACP.....	178
3.	ROLE DU CANAL TRPM7 DANS LA TRANSFORMATION VERS UN PHENOTYPE INVASIF DES CELLULES NON-CANCEREUSES	188
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		194
VALORISATION DES TRAVAUX		199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		202

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie et localisation du pancréas dans la cavité abdominale.	15
Figure 2 : Coupe de lobule pancréatique coloré à l'hématoxyline et à l'éosine (x66).	16
Figure 3 : Histologie d'un îlot de Langerhans.	16
Figure 4: Anatomie du système exocrine du pancréas.	18
Figure 5 : Histologie d'un lobule pancréatique.	19
Figure 6 : Stratégie thérapeutique en fonction du classement de l'ACP.	24
Figure 7 : Progression de l'ACP.	29
Figure 8 : Mutations associées à la progression de l'ACP.	29
Figure 9 : Principales voies de signalisation impliquant l'oncogène Kras	30
Figure 10 : Voies ou mécanismes connus ou émergents altérés dans la progression de l'ACP.	32
Figure 11 : Hallmarks of cancer	33
Figure 12 : Modèles d'acquisition de la capacité métastatique.	35
Figure 13: Les différentes transitions permettant l'acquisition d'une mobilité cellulaire.	36
Figure 14 : Contribution de l'EMT à la progression tumorale	37
Figure 15 : Interactions protéiques dans les sites d'adhésion focaux des cellules cancéreuses.	38
Figure 16 : Etapes principales de la cascade métastatique.	39
Figure 17 : Implication des MMPs dans la préparation de la niche métastatique.	42
Figure 18 : Structure des MMPs.	43
Figure 19 : Structure et composition de l'invadopode.	45
Figure 20 : Etapes de formation de l'invadopode.	46
Figure 21 : Acteurs du système activateur du plasminogène.	48
Figure 22 : Cycle d'activation d'Hsp90	51
Figure 23 : Mécanismes d'activation d'Hsp90.	52
Figure 24 : Protéines membranaires impliqués dans les mouvements de solutés.	57
Figure 25 : Rôle du stroma tumoral et des canaux dans l'invasion cellulaire	66
Figure 26 : Classification phylogénétique des canaux TRP.	71
Figure 27: Structure du canal TRPM7.	73
Figure 28 : Courant généré par TRPM7.	74
Figure 29 : Structure du domaine kinase	75
Figure 30 : Sites d'autophosphorylation de TRPM7 et substrat de la kinase.	77
Figure 31 : Régulation physiologique du domaine canalaire et kinase de TRPM7	81
Figure 32 : Parallèle entre la répartition des sites et sols pollués et la mortalité par cancer en France métropolitaine.	94
Figure 33 : Répartition des différentes familles de polluants dans les sites contaminés	94
Figure 34 : Constructions de TRPM7 utilisées et plasmide de surexpression.	101
Figure 35 : Description d'un cycle de réaction de PCR.	107
Figure 36 : Schéma du système CRISPR/Cas9.	109
Figure 37: Stratégie d'inactivation du domaine kinase de TRPM7 par CRISPR/Cas9.	110
Figure 38 : Méthode d'analyse du quench Mn^{2+}	123
Figure 39 : Principe de la PLA.	131

Figure 40 : Expression de TRPM7 de Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non- cancéreuses pancréatiques.....	140
Figure 41 : Effets des extinctions par siRNA sur l'expression protéique de TRPM7 et Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques..	141
Figure 42 : Rôle de la kinase du canal TRPM7 dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques.	142
Figure 43 : Rôle de TRPM7 dans l'invasion des cellules non-cancéreuses pancréatiques.....	143
Figure 44 : Rôle d'Hsp90α dans l'invasion cellulaire.....	144
Figure 45 : TRPM7 et Hsp90α régulent l'invasion par une voie commune dans les cellules d'ACP. ..	145
Figure 46 : Localisation de TRPM7 et Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques.....	146
Figure 47 : Interaction entre TRPM7 et Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques.....	147
Figure 48 : Implication de TRPM7 dans la phosphorylation d'Hsp90α sur ses résidus sérine dans les cellules d'ACP..	148
Figure 49 : Implication du domaine kinase dans la localisation de TRPM7 et Hsp90α dans les cellules d'ACP..	149
Figure 50 : Rôle du Mg ²⁺ dans l'invasion régulée par la kinase de TRPM7 et Hsp90α dans les cellules d'ACP.	150
Figure 51 : Expression de TRPM7 sauvage suite à la délétion du domaine kinase endogène de TRPM7 par la technique CRISPR-Cas9 dans les cellules d'ACP.	151
Figure 52 : Conclusion sur les mécanismes impliquant TRPM7 dans l'invasion cellulaire basale des cellules d'ACP.	188
Figure 53 : Conclusion sur les mécanismes impliquant TRPM7 dans l'invasion cellulaire stimulée par le traitement au Cd ²⁺	193
Figure 54 : Schéma de conclusion générale sur le rôle de TRPM7 dans l'invasion cellulaire.	196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Facteurs de risque du cancer du pancréas	20
Tableau 2: Classification TNM	21
Tableau 3 : Gradation des ACP basée sur la classification TNM.	21
Tableau 4 : Protéases impliquées dans l'invasion cellulaire cancéreuse	40
Tableau 5 : Classifications des MMPs.....	43
Tableau 6 : Structure d'Hsp90.....	50
Tableau 7 : Modifications post traductionnelles d'Hsp90	54
Tableau 8 : Régulation pharmacologique de TRPM7	82
Tableau 9 : Corrélation de la surexpression de TRPM7	89
Tableau 10 : Conditions de culture des lignées cellulaires.....	98
Tableau 11 : Séquence des ARN interférents (siRNA).....	103
Tableau 12 : Description des kits et des programmes de transfection selon la lignée cellulaire.	103
Tableau 13 : Composition du mix de transcription inverse.....	105
Tableau 14 : Composition du mix de PCR qualitative.	106
Tableau 15 : Liste des primers.....	106
Tableau 16 : Composition du mix de PCR quantitative.	107
Tableau 17 : Plan d'une plaque pour les transfections CRISPR/Cas9.....	117
Tableau 18 : Composition des mix de transfection selon les expériences CRISPR/Cas9.	118
Tableau 19 : Conditions de sélection des clones à la puromycine.	119
Tableau 20 : Temps d'incubation des sondes en fonction de la lignée cellulaire.	121
Tableau 21 : Composition du milieu extracellulaire pour les expériences d'imagerie.	121
Tableau 22 : Composition du RIPA complet.	125
Tableau 23 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.....	126
Tableau 24 : Liste des anticorps et des billes magnétiques utilisés en immunoprécipitation.	129
Tableau 25 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.....	130
Tableau 26 : Composition de la solution d'incubation des anticorps secondaires.	131

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : adénocarcinome canalaire pancréatique	FDA : food and drug administration
ADAM : a disintegrin and metalloproteinase	GAPH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
ADAMTs : a disintegrin and metalloproteinase with Thrombospondin Motifs	GDP : guanosine di phosphate
ADN : acide désoxyribonucléique	GFP : green fluorescent protein
ADNc : ADN complémentaire	GPI : glycosylphosphatidylinositol
AJCC : american Joint Committee on Cancer	GTP : guanosine tri phosphate
AM : acetoxymethyl-ester	H ⁺ : proton
AMPC : Adénosine monophosphate 3', 5' cyclique	HEK : human Embryonic Kidney
AMT : amoeboid to mesenchymal transition	HIF : hypoxia inducible Factor
ANOVA : analysis of Variance	HSE : heat shock element
AP-1 : activator protein 1	HSF1 : heat shock factor 1
ARNm : acide ribonucléique messenger	Hsp : heat shock protein
ASIC : acid-sensing ion channel	IL : interleukine
ATCC : american Type Culture Collection	INK4A : inhibitor of cyclin dependant kinase 4A
BCTC : 3-trifluoromethyl-pyridin- 2-yl)-piperazine-1-carboxylic acid	IPMN : intraductal papillary mucinous neoplasms
BET : bromure d'éthyldium	IRM : imagerie par résonance magnétique
BRCA2 : breast cancer 2	K ⁺ : ion potassium
BSA : bovine serum albumin	KDa : Kilo Dalton
CA : carbohydrate antigen	KO : knock out
CAPE : caffeic acid phenethyl ester	K-ras : kirsten rat sarcoma
CAT : collective to amoeboid transition	magNUM : magnesium nucleotide regulated metal ion current
CC : coiled-coil	MAPK : mitogen activated protein kinases
CEA : carcinoembryonic antigen	MAT : mesenchymal-to-ameboid Transition
Cd ²⁺ : ion cadmium	MBP : Myelin basic protein
CI50 : concentration inhibitrice 50	MCN :Mucinouscysticneoplasms
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer	MCU : Mitochondrial calcium uniporter
CLIC : chloride intracellular channel	MEC : Matrice extracellulaire
DAPI : di-aminido phenylindol	NFAT : nuclear factor of activated T-cells
DMEM-F12 : dulbecco modified eagle medium / nutrient mixture F-12 ham	Mg ²⁺ : ion magnésium
DMSO : dimethyl sulfoxide	MHCK B : myosine heavy chain kinase B
dNTP : desoxy nucleotides triphosphates	MIC : magnesium inhibited current
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acide	microARN : micro acide ribonucléique
eEF2 : eukaryotic translation elongation factor 2	mM : millimoles
EGFR : epidermal growth factor receptor	MMPs : matrix metalloproteinases
EGF : epidermal growth factor	Mn ²⁺ : ion manganèse
EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid	MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
EMT : epithelial-to-mesenchymal transition	Na ⁺ : ion sodium
EPA : acide écosapentaénoïque	nm : nanomètres
ER : estrogen receptor	PAI-1 : plasminogenactivator inhibitor-1
ERK : extracellular signal-regulated kinase	PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasias
FAK : focal adhesion kinase	Pb : paire de bases
	PBS : phosphate buffer saline

PCR : polymerase chain reaction
PET : polyéthylène-téréphtalate
PFA : paraformaldéhyde
PI3K : phosphatidyl inositol triphosphate kinase
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLA : proximity ligation assay
PLC : phospholipase C
qPCR : PCR quantitative
Ras : rat sarcoma
RCPG : récepteur couplés aux protéines G
ROS : reactive oxygen species
Rpm : round per minutes
RT : retro-transcription
SDS : sodium dodecyl sulfate
SEM : standard error of the mean
Ser : résidu serine
shRNA : short hairpin ribonucleic acid
siRNA : small interfering ribonucleic acid
SOC : store Operated Channel
STAT : signal transducers and activators of transcription

STIM : stromal interaction molecule
STK11 : serine thréonine kinase 11
TC : tomographie comptée
TEA : triéthylamine
TEP : tomographie par émissions de positions
TGF β : transforming growth Factor β
Thr : résidu threonine
TIMPs : tissue inhibitors of metalloproteinases
TNCD : Thésaurus National de Cancérologie Digestive
TNF α : tumor necrosis factor α
TRP : transient receptor potential
TRPM7 : transient receptor potential melastanin-related 7
TNM : tumor – node –metastasis
tPA : tissularplasminogenactivator
TTX : tétródotoxine
uPA : urokinase plasminogen activator
VEGF : vascular endothelial growth factor
WT : wild type
Zn²⁺ : ion zinc
 μ M : micromoles
2-APB : 2-Aminoethoxydiphenyl borate
 α SMA : smooth muscle actin α

INTRODUCTION

Les avancées en recherche et en médecine améliorent la compréhension des mécanismes d'apparition et de développement du cancer. Ces avancées permettent de développer de nouveaux biomarqueurs et de meilleurs traitements, exceptés pour certains cancers, où les connaissances sur la maladie progressent mais sans recul de la mortalité, comme, par exemple, pour le cancer du pancréas.

Le cancer du pancréas, malgré son incidence faible, constitue la quatrième cause de mortalité tous cancers confondus. Les projections récentes sont défavorables et montrent qu'il sera la deuxième cause de décès par cancer en 2030. Particulièrement redoutable, il présente une survie médiane d'environ 6 mois. Cette faible survie est due à une combinaison de plusieurs facteurs. Tout d'abord, ce cancer n'est pas détectable à des stades précoces car il n'y a pas de symptômes spécifiques, de biomarqueurs utilisables pour le dépistage et les techniques d'imagerie actuelles manquent de précision. La détection tardive de la tumeur entraîne une possibilité de traitement par chirurgie très faible (10 %). Il n'existe pas de traitements efficaces car la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie est très élevée. Les possibilités thérapeutiques sont limitées également par une capacité importante à former des tumeurs secondaires hors du pancréas (appelées métastases). De ce fait, il y a nécessité de mieux comprendre les mécanismes en lien avec l'apparition des métastases qui est la principale cause de mortalité dans le cancer. De plus, ces tumeurs secondaires sont détectées chez plus de la moitié des patients atteints de cancers du pancréas. Parmi ces cancers, plus de 80 % sont des adénocarcinomes canaux pancréatiques (ACP). L'ACP est donc un problème de santé publique majeur et il y a un besoin urgent de mieux comprendre sa progression et plus particulièrement les mécanismes impliqués dans l'apparition des métastases.

L'invasion cellulaire est un mécanisme clé de la dissémination tumorale. Elle permet aux cellules agressives dérivant de la tumeur primaire de former des métastases au cours de la cascade métastatique. Au cours de ce processus, les cellules vont d'abord traverser la membrane basale délimitant les épithéliums, correspondant à l'invasion cellulaire. Elles vont ensuite progresser dans le microenvironnement, ce qui correspond à l'étape de migration cellulaire afin de pénétrer dans la circulation sanguine, phénomène appelé l'intravasation. Des cellules vont survivre dans la circulation et en sortir (l'extravasation) afin de former des

métastases dans des tissus distants de la tumeur primaire. L'invasion est donc un mécanisme précoce de la cascade métastatique. Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques comme la contraction musculaire ou la communication nerveuse. Leur rôle a également été mis en évidence dans les mécanismes de progression du cancer tels que l'invasion cellulaire.

Parmi ces canaux, la protéine TRPM7 (transient receptor potential melastanin-related 7) appartient à la famille des canaux TRP qui sont des canaux localisés dans la membrane plasmique des cellules et vont réguler le passage des ions. TRPM7 est perméable à des ions physiologiques (calcium (Ca^{2+}) et également magnésium (Mg^{2+})) mais également à des ions probablement carcinogènes comme le cadmium (Cd^{2+}) qui est un polluant fréquemment retrouvé dans l'environnement. Ce canal est présent en plus grande quantité dans les tissus de patients atteints de cancers du pancréas et du sein notamment, et son expression est reliée aux paramètres cliniques de mauvais pronostic (diminution de la survie, apparition de métastases).

Ce projet propose d'étudier le rôle du canal TRPM7 dans les mécanismes cellulaires et moléculaires en lien avec le développement de l'ACP. TRPM7 régule la migration dépendante du Mg^{2+} des modèles cellulaires cancéreux pancréatiques humains. TRPM7 pourrait donc être un acteur important dans le développement des métastases notamment dans la capacité des cellules à envahir leur environnement proche. La particularité du canal TRPM7 par rapport aux autres canaux ioniques est qu'il appartient à la famille des « chanzymes » (canal ionique + enzyme). Ce domaine enzymatique kinase, capable de phosphoryler des protéines, est impliqué dans les mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. Le but de ce projet de recherche est donc d'étudier le rôle du canal TRPM7, et plus particulièrement de son domaine kinase, dans le mécanisme d'invasion cellulaire dans le modèle d'ACP. En parallèle de ce projet, nous travaillerons sur le rôle de TRPM7 dans un modèle de cellules non-cancéreuses devenant invasives suite à l'exposition à un polluant environnemental, le Cd^{2+} .

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : LE PANCREAS, DE LA PHYSIOLOGIE A LA PATHOLOGIE

1. PHYSIOLOGIE DU PANCREAS

1.1. Anatomie

Le pancréas est une glande annexe du système gastro-intestinal. Elle mesure environ 20 cm de long, 5 cm de haut, 2 cm d'épaisseur avec une masse entre 60 et 80 grammes. Elle possède une fonction exocrine qui participe à la digestion et une fonction endocrine qui permet de réguler la glycémie. Cette glande mixte est située en position transverse dans la cavité abdominale derrière l'estomac et devant l'aorte abdominale et la veine cave inférieure. Elle est constituée de quatre parties (**Figure 1**) :

- la tête, logée dans le cadre duodénal, prolongée par le processus unciné (crochet ou petit pancréas) en arrière de la veine mésentérique supérieure.
- le col pancréatique placé devant la veine porte.
- le corps, dont la face postérieure est marquée par l'empreinte de l'artère splénique.
- la queue à proximité des vaisseaux spléniques.

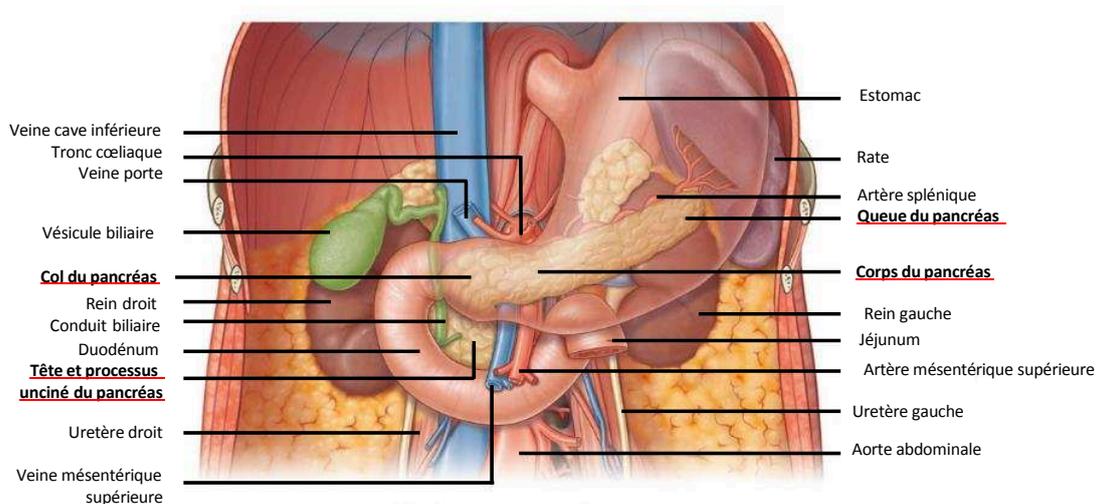


Figure 1 : Anatomie et localisation du pancréas dans la cavité abdominale.

Le pancréas est situé en position transverse dans la cavité abdominale derrière l'estomac et devant l'aorte abdominale. Il est composé de quatre parties : le processus unciné, la tête, le col, le corps et la queue (Drake et al., 2017).

1.2. Fonction endocrine

Le pancréas possède une fonction endocrine non-digestive qui permet la sécrétion des hormones régulant le métabolisme du glucose. La glycémie normale à jeun se situe entre 0,8

et 1,2 g/L de sang. L'unité fonctionnelle endocrine est l'îlot de Langerhans. Les îlots, délimités par une fine lame de tissu conjonctif, sont disséminés en gradient de la tête à la queue dans le parenchyme pancréatique. Ils représentent une faible proportion du pancréas total (1-2 % de la masse de l'organe) (**Figure 2**).

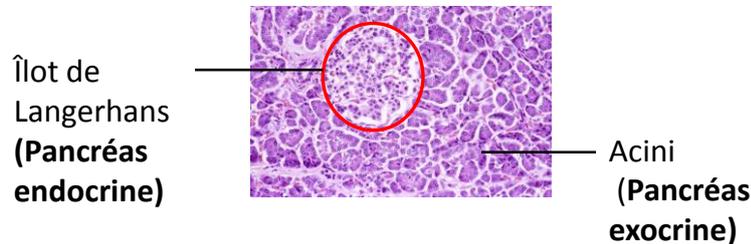


Figure 2 : Coupe de lobule pancréatique colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (x66). La partie exocrine, composée des acini, représente la partie majeure du pancréas (85 % de l'organe). La partie endocrine, minoritaire, est composée des îlots de Langerhans.

Les îlots sont constitués de six types cellulaires. Chaque type cellulaire de l'îlot sécrète une hormone spécifique. Le glucagon est synthétisé par les cellules α disséminées dans l'îlot (20 %) et l'insuline par les cellules β formant le corps de l'îlot (70 %). L'insuline hypoglycémiante va permettre, lors de l'augmentation de la glycémie après un repas, d'augmenter la captation du glucose et la formation de réserves de glycogène dans les muscles et le foie et de triglycérides dans les tissus adipeux. Quand la glycémie diminue entre les repas, le glucagon hyperglycémiant va stimuler la production de glucose à partir du glycogène hépatique. Les trois autres hormones produites par le pancréas sont la somatostatine sécrétée par les cellules δ (delta) (5 à 10 %), le polypeptide pancréatique par les cellules PP (1 à 2 %) et la ghréline par les cellules à ghréline (**Figure 3**).

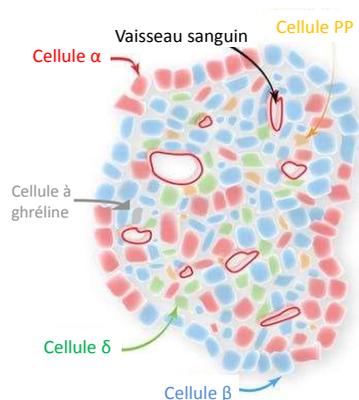


Figure 3 : Histologie d'un îlot de Langerhans.

Les îlots sont composés de six types cellulaires, (chacun sécrétant une hormone) : les cellules α (insuline), les cellules β (glucagon), les cellules δ (somatostatine), les cellules PP (polypeptide pancréatique) et les cellules à ghréline (modifié d'après Forget A, 2018).

1.3. Fonction exocrine

La partie exocrine représente la majeure partie du pancréas (environ 85 % de la masse de l'organe). Le pancréas assure sa fonction exocrine en sécrétant le suc pancréatique dont la fonction est de digérer les macromolécules des aliments en molécules assimilables par l'organisme. Pour assurer cette digestion, ce suc est constitué d'enzymes digestives contenues dans un liquide aqueux riche en ions bicarbonates. Ces ions bicarbonates vont neutraliser la forte acidité du chyme, résultat de la digestion de la nourriture par l'estomac, afin de garantir une activité optimale des enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle.

Le suc pancréatique contient plusieurs enzymes qui vont dégrader des substrats spécifiques. Les enzymes non-protéolytiques sont secrétées sous forme active. L'amylase digère l'amidon alors que la lipase est l'enzyme majeure de la digestion des triglycérides. La ribonucléase et désoxyribonucléase ciblent les acides nucléiques. Les enzymes protéolytiques sont synthétisées sous forme inactive pour ne pas détruire les protéines des cellules pancréatiques. Par exemple, le trypsinogène est transformé en trypsine active par le pH acide arrivant de l'estomac et l'entérokinase attachée à la membrane des cellules épithéliales du court segment initial de l'intestin grêle, le duodénum. La trypsine va ensuite activer d'autres enzymes qui vont à leur tour dégrader les protéines (la chymotrypsine et la carboxypeptidase par exemple).

D'autres mécanismes permettent d'éviter la dégradation du pancréas par ses enzymes digestives. Un mécanisme physique par gradient de pression permet un flux permanent du suc pancréatique évitant sa stagnation. Les autres mécanismes agissent sur la régulation de l'activité des enzymes soit en les séquestrant dans des organites intracellulaires particuliers, les grains de zymogène, soit grâce à la présence d'inhibiteurs physiologiques ou soit par des boucles d'autorégulation.

La sécrétion du suc pancréatique s'élève au cours du repas grâce à deux hormones stimulatrices produites par les cellules de la muqueuse duodénale. L'augmentation de l'acidité dans le duodénum va permettre la libération de la sécrétine qui va augmenter le pH en stimulant la sécrétion d'eau et d'ions bicarbonate. L'enrichissement du contenu duodénal en acides gras et acides aminés va stimuler la libération de cholécystokinine qui stimule la sécrétion des enzymes pancréatiques (Widmanier 2004).

Le suc pancréatique est collecté par un système de canaux et déversé dans le duodénum. Le pancréas possède deux canaux collecteurs principaux mesurant de 2 à 4 millimètres de diamètre :

-le canal pancréatique principal (canal de Wirsung) parcourt tout l'organe. Il part de la queue, traverse le corps et le col, puis forme un coude avant de pénétrer dans la tête. Il débouche avec le canal cholédoque dans l'ampoule hépato-pancréatique qui se déverse dans le duodénum par la papille duodénale majeure.

-le canal de Santorini qualifié de canal accessoire car il n'est pas présent chez tous les individus. Il part du coude du canal principal et draine les sécrétions de la tête. Ces sécrétions seront déversées dans le duodénum par la papille duodénale mineure située 3 cm au-dessus de la papille majeure (**Figure 4**).

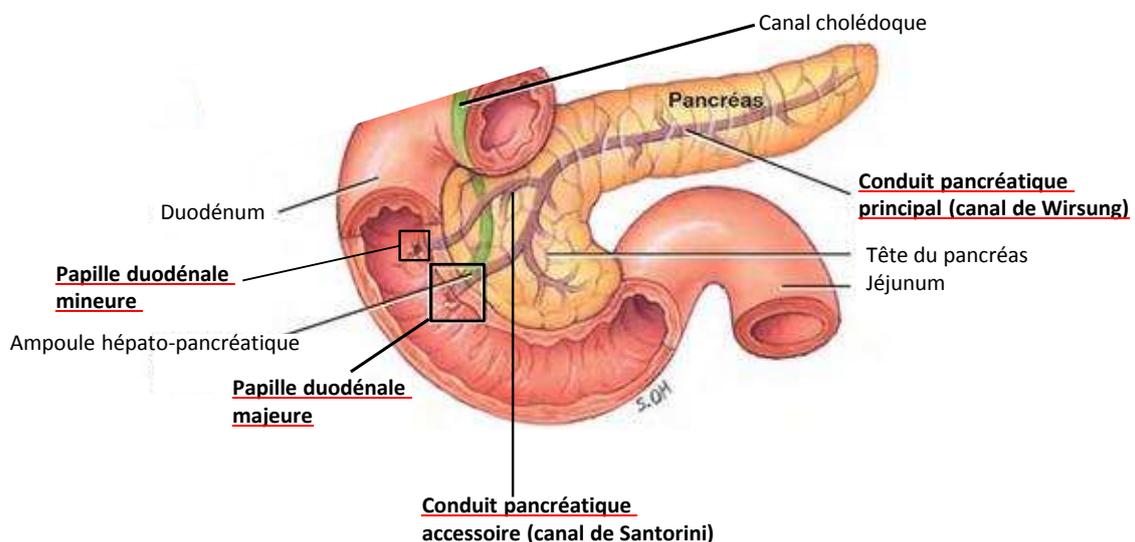


Figure 4: Anatomie du système exocrine du pancréas.

Le système exocrine comprend deux canaux : le canal principal de Wirsung drainant les sécrétions de tous l'organe et le canal accessoire de Santorini drainant la tête du pancréas. Le suc pancréatique est déversé dans le duodénum par deux papilles (majeure et mineure) (modifié d'après Tortora et al., 2017).

L'unité fonctionnelle exocrine est le lobule formé de plusieurs acini. Un acinus est composé de plusieurs types cellulaires (**Figure 5**). Il comprend des cellules acineuses de forme pyramidale dont la face apicale est en contact avec la lumière. L'activité exocrine de ces cellules, permettant la sécrétion des enzymes du suc pancréatique, est possible grâce à de nombreux grains de zymogène, un réticulum endoplasmique et une activité ribosomale développés dans leur cytoplasme. La sécrétion des ions bicarbonates est effectuée par les cellules épithéliales formant le système de canaux collecteurs ramifiés. Les petits canaux

intercalaires sont formés par les cellules centro-acineuses cylindriques bordant la lumière de l'acinus et sont accolées aux cellules acineuses. Les canaux intra- et interlobulaires sont formés par des cellules épithéliales de type canalaire. Ces canaux se déversent dans les deux canaux collecteurs principaux. Les lobules sont séparés par des tissus conjonctifs et gras dans lesquels se situent les nerfs, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les canaux excréteurs.

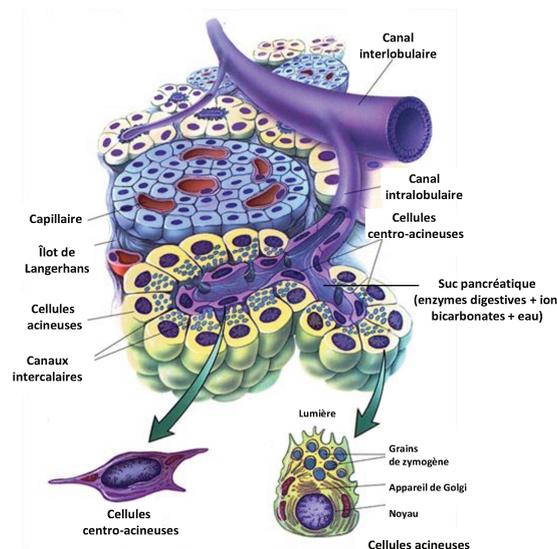


Figure 5 : Histologie d'un lobule pancréatique.

Les cellules acineuses du lobule vont sécréter les enzymes digestives alors que les cellules épithéliales des canaux vont sécréter les ions bicarbonates. Le suc pancréatique est ensuite drainé par les canaux intercalaires, intralobulaires et interlobulaires (Faculté de Médecine de Yale).

2. LE CANCER DU PANCREAS

Actuellement, le cancer cause 8,2 millions de morts à travers le monde, chaque année. Le cancer du pancréas se situe en quatrième position derrière le cancer du poumon, les cancers de la prostate et du sein et le cancer colorectal. Les prédictions d'ici 2030 montrent une incidence des cancers augmentée de 70 %. Ces projections montrent également un changement dans le classement des cancers les plus mortels. Une augmentation de la mortalité liée au cancer du pancréas le placerait en deuxième position alors qu'une baisse serait observée pour celle des autres cancers (Rahib et al., 2014). Le cancer du pancréas fait partie des cancers de la sphère digestive qui comprennent les cancers de l'estomac, du foie, du côlon et du rectum et du canal anal. C'est le cancer avec le pronostic le plus défavorable avec 330 300 décès par année pour une prévalence et une incidence mondiales estimées de 211 500 cas et 337 900 cas, respectivement (données GLOBOCAN, 2012). Le taux de survie

globale à 5 ans est très faible autour de 5 %. Sa mortalité élevée en fait un problème de santé publique important en dépit de son incidence relativement faible comparée aux autres cancers.

2.1. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque environnementaux généraux des cancers (tabagisme, consommation d'alcool et obésité) et plus spécifiques sont décrits pour le cancer du pancréas (**Tableau 1**).

Tableau 1: Facteurs de risque du cancer du pancréas
(Modifié d'après Becker et al., 2014, Bochatay et al., 2014).

Facteurs de risques	Augmentation du risque
Tabagisme	1,7 – 2,2
Consommation d'alcool (+3 verres/jour)	1,2-1,4
Obésité	1,5-2,8
Consommation de viandes rouges	1,2
Pancréatite chronique	13,3
Diabète de type 1	2
Diabète de type 2	1,8
Gastrectomie	1,5
Cholécystectomie	1,2
Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	1,4

2.2. Les différents types de cancers du pancréas et symptômes

Il existe 2 groupes de cancers atteignant le pancréas classés en fonction de leur origine histologique (exocrine ou endocrine). Les cancers d'origine exocrine représentent la majeure partie (> 90 %). L'étude des signatures moléculaires des tumeurs permet de préciser la classification (Bailey et al., 2016). L'ACP (adénocarcinome canalaire pancréatique) est la tumeur la plus fréquente du cancer du pancréas (80 %). Sa localisation majeure est dans la tête puis elle peut être localisée dans le corps et la queue du pancréas (Pitau 2017).

La 8^{ème} version de la classification TNM (tumor-node-metastasis) de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) est principalement utilisée pour classer les tumeurs et pour la prise en charge des patients. Elle prend en compte plusieurs critères : la taille de la tumeur primaire, la présence de ganglions envahis proches et de métastases distantes (**Tableau 2**). Ces critères permettent de classer les ACP selon le grade (**Tableau 3**). Plus le grade est élevé,

plus les cellules cancéreuses sont indifférenciées et invasives (Cancer du pancréas, Dernière mise à jour le 25/06/2018, Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD)).

Tableau 2: Classification TNM

TNM (critères)	Stade	Localisation et envahissement
T (tumor) : taille de la tumeur et étendue par rapport au pancréas	is	Carcinome <i>in situ</i>
	1a	≤ 0,5 cm
	1b	> 0,5 cm et < 1 cm
	1c	>1 cm et ≤ 2 cm
	2	2 cm < Taille < 4cm
	3	Taille > 4cm
	4	Tumeur extra-pancréatique avec envahissement de l'artère cœliaque ou mésentérique supérieure
N (node) : ganglions proches envahis ? Nombres ?	0	Non
	1	Oui (au maximum 3)
	2	Oui (4 ou plus)
M (métastase) : présence de métastases distantes ?	0	Non
	1	Oui

Tableau 3 : Gradation des ACP basée sur la classification TNM.

Grade	T	N	M
0	is	0	0
1-a	1		
1-b	2		
2-a	3		
2-b	1 – 2 – 3		
3	1 – 2 – 3	1	
	4	NO → N2	
4	T1 → T4	NO → N2	1

Les tumeurs, selon leur extension, peuvent être classées dans 4 groupes cliniques en fonction de la possibilité que la tumeur soit traitée par chirurgie :

-résécable

-résécable limite présentant un envahissement vasculaire local (« borderline »)

-non-résécable localement avancé

-non-résécable métastatique

Il est parfois difficile de classer les cancers dans la catégorie résécable limite à cause du stroma dense et de la présence d'une inflammation qui vont influencer l'interprétation des résultats cliniques (Adamska et al., 2017).

Dans les premiers stades de son développement, l'ACP est asymptomatique. L'apparition des premiers symptômes révèle une tumeur déjà bien développée. Les patients atteints d'ACP peuvent présenter des symptômes non-spécifiques tels que : de la fatigue, des troubles de la digestion entraînant une perte d'appétit et de poids. Un diabète récent (< à 2 ans) ou plus ancien est un symptôme dans un cas sur deux. Une douleur abdominale intense à irradiation postérieure ou dorsale évoque une tumeur ayant envahi le tronc cœliaque. La présence d'urines foncées et de selles décolorées accompagnées d'une jaunisse (ictère) peuvent révéler une tumeur de la tête du pancréas (Cancer du pancréas, Dernière mise à jour le 25/06/2018, TNCD, Pitau 2017).

Un bilan comprenant une prise de sang avec une étude de la fonction hépatique et une échographie abdominale est nécessaire en cas de présence de ces symptômes. Ce bilan permettrait de suspecter au plus tôt le cancer du pancréas afin d'augmenter les chances que celui-ci soit traité chirurgicalement (Pitau 2017).

2.3. Diagnostic

Dans la majorité des cancers, plus tôt est le diagnostic, plus grande est la probabilité de guérison. Lorsque ce diagnostic précoce est possible, il permet la mise en place d'un dépistage à grande échelle. Cependant pour l'ACP, il n'existe pas de dépistage précoce de la maladie. En effet, la faible incidence actuelle de ce cancer et le développement de tests, non-invasifs et fiables, rendraient le coût d'un programme de dépistage trop élevé et trop invasif pour le patient. De plus, les techniques de détection ne permettent pas d'observer, de manière efficace, certaines lésions précurseurs de ce cancer (Bochatay et al., 2014).

Le diagnostic utilise différentes techniques d'imagerie. La technique utilisée en première intention est le scanner à rayon X (ou tomographie assistée par ordinateur - TC). Les autres techniques sont la tomographie par Emission de Positons (TEP) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) non-irradiante donnant des images de meilleures qualités, mais leur sensibilité reste comparable à la TC. L'échoendoscopie donne des images d'excellente qualité sans irradiation, mais nécessite une sédation profonde des patients. Cette technique sert de guide à une biopsie afin de faire un diagnostic cytopathologique (Bochatay et al., 2014, Zhang et al., 2018).

Il existe de nombreux marqueurs sériques potentiels augmentés chez les patients symptomatiques (43 actuellement). Néanmoins, ils ne sont pas utilisés en routine, car ils manquent de sensibilité et de spécificité (Bunger et al., 2011). Le marqueur le plus étudié est le CA 19-9 (carbohydrate antigène 19-9). Il s'agit d'une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules cancéreuses pancréatiques, mais également au niveau de l'épithélium de tissus variés. Elle a été caractérisée comme marqueur sérique pour la première fois chez des patients atteints de cancer du côlon en 1981 puis quelques années plus tard dans le cancer du pancréas (Del Villano et al., 1983, Koprowski et al., 1981). Sa sensibilité et sa spécificité sont très variables dans la littérature à cause de son expression très large. La proportion de faux négatifs (absence d'expression chez 4 à 15 % des individus) mais aussi de faux positifs est importante suite à l'analyse des résultats (Zubarik et al., 2011). De plus, le taux de cette protéine peut être augmenté dans de nombreuses autres affections (Steinberg 1990). En préopératoire, la mesure de son taux pourrait aider à déterminer si la chirurgie est envisageable. En postopératoire, un taux de CA19-9, plus important que la normale, est potentiellement corrélé avec une médiane de survie plus élevée (Ballehaninna et al., 2012).

Un autre exemple est le CEA (carcinoembryonique antigène) qui est une protéine détectée en très faible quantité dans le sang de personnes adultes. Une concentration plus élevée de CEA est détectée dans les sécrétions pancréatiques de patients atteints de cancers malins comparés à des maladies pancréatiques bénignes (Futakawa et al., 2000).

Une étude récente montre la capacité de deux nouveaux marqueurs sériques, la périostine et CA-242, à discriminer les faux négatifs parmi les marqueurs connus (Dong et al., 2018). D'autres marqueurs sont étudiés mais ne sont pas validés actuellement comme par exemple la thrombospondine 2, l'ADN tumoral circulant et les vésicules extracellulaires circulantes (Cancer du pancréas, Dernière mise à jour le 25/06/2018, TNCD).

2.4. Traitements

L'ACP est généralement diagnostiqué de manière tardive dû au fait de l'absence de symptômes précoces. Une fois le cancer détecté, les lésions causées par la tumeur peuvent entraîner une dégradation très rapide de la santé du patient, limitant les possibilités thérapeutiques (**Figure 6**). Ce cancer est parmi les plus difficiles à soigner à cause notamment de son potentiel de résistance aux chimio- et radiothérapies. Les traitements permettent néanmoins de faire passer le taux survie à 5 ans de 5 à 20 % (Koorstra et al., 2008). En plus des paramètres de la tumeur, le choix du traitement prend en compte d'autres paramètres concernant le patient tels que l'âge, les antécédents médicaux et chirurgicaux mais également l'état de santé général (Pitau 2017).

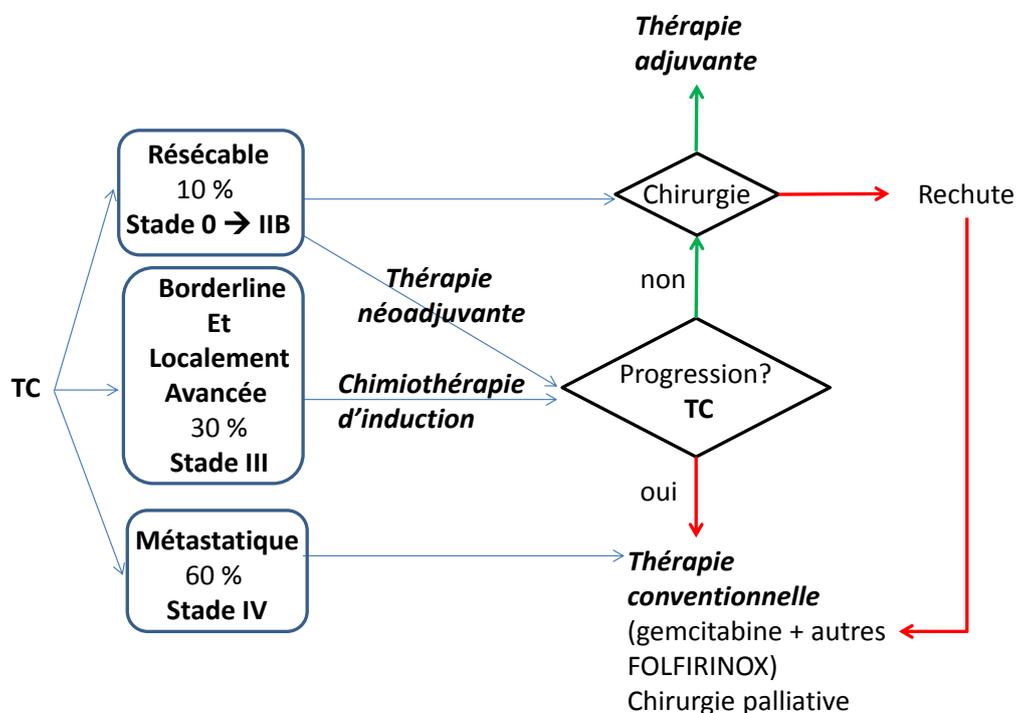


Figure 6 : Stratégie thérapeutique en fonction du classement de l'ACP.

La tomographie computed (TC), utilisée en première intention, permet de classer l'ACP dans un groupe clinique qui va déterminer la prise en charge du patient (Modifié d'après Adamska et al., 2017).

A. Traitement de l'ACP non-métastatique

La chirurgie est le seul traitement curatif. Pour les cancers de la tête du pancréas, une duodéno-pancréatectomie céphalique est l'intervention de référence. Une spléno-pancréatectomie gauche est effectuée pour les tumeurs localisées dans le corps ou la queue. Au cours de ces interventions, la tumeur et les ganglions lymphatiques drainant la zone

opérée du pancréas sont retirés. La pancréatectomie totale est très rare. Une tumeur n'est résecable que dans les stades précoces de la maladie si sa progression reste locale. Au moment du diagnostic, seulement 20 % des patients pourront en bénéficier. Une fois que la tumeur est classée dans la catégorie borderline et localement avancée, le traitement chimiothérapique devient la référence (Cancer du pancréas, Dernière mise à jour le 25/06/2018, TNCD).

Le but de la chirurgie est de réussir une résection dite « R0 » où toute la tumeur est retirée. Après la chirurgie, 40 % des patients sont classés en résection dite « R1 ». Elle correspond à une résection macroscopique de la tumeur mais il reste des cellules tumorales disséminées qui sont capables de reformer une tumeur dans les 6 à 24 mois post-chirurgie. Il est donc nécessaire d'associer la chirurgie à d'autres traitements afin d'augmenter la probabilité de guérison (Alexakis et al., 2004).

Les traitements néoadjuvants permettent de diminuer l'extension de la tumeur pour augmenter la probabilité de résection R0. Le but est également d'augmenter la chimiosensibilité de la tumeur aux traitements ultérieurs (Brunner et al., 2010). Ils sont généralement composés d'un agent anticancéreux seul (en général la gemcitabine) ou en combinaison comme par exemple avec le protocole FOLFIRINOX (FOL pour acide folinique, F pour 5-fluorouracile, IRIN pour irinotécan, OX pour oxaliplatine) qui est plutôt utilisé dans le traitement des ACP métastatiques. L'intérêt de ce type de traitement reste encore à prouver car ils retardent la chirurgie et peuvent augmenter la progression du cancer. De plus, il n'y a pas de référence concernant le type et la durée du traitement. Le nombre limité de cas de cancers résecables est également un frein aux études cliniques (Adamska et al., 2017).

Une thérapie adjuvante est définie comme le traitement administré une fois que la tumeur a été traitée par chirurgie. Elle est prescrite pour diminuer le risque de récurrence et de développement des métastases en éliminant les cellules tumorales disséminées dans l'organisme. En pratique, environ 80 % des patients traités chirurgicalement auront une récurrence locale ou métastatique (Hishinuma et al., 2006). Ce traitement est donc indiqué chez tous les patients opérés et doit débuter dans les 3 mois suivant la chirurgie. Le traitement doit durer 6 mois. Il est constitué d'un agent chimiothérapique seul ou en combinatoire (on peut citer comme exemple la gemcitabine, le 5-fluorouracile ou le protocole FOLFIRINOX). D'après les essais cliniques récents, l'association à la radiothérapie n'apporte pas de bénéfice (Cancer du pancréas, Dernière mise à jour le 25/06/2018, TNCD).

La radiothérapie est une technique non ciblée qui utilise des rayons ionisants pour casser les molécules d'acide nucléique. La dose généralement utilisée (1,8 à 2 Gray par jour correspondant au total à environ 45-60 Gray pendant six semaines) est élevée augmentant la probabilité d'atteindre d'autres organes et d'entraîner des effets secondaires importants. Ce traitement est donc réservé pour les tumeurs très agressives (Vincent et al., 2011). Plusieurs études cliniques sont en cours pour déterminer la combinaison thérapie néoadjuvante / adjuvante la plus efficace. On peut citer comme exemple la combinaison FOLFIRINOX / gemcitabine ou abraxane / gemcitabine (Adamska et al., 2017).

B. Traitement de l'ACP métastatique

Depuis 1997, l'agent de référence approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des ACP métastatiques était la gemcitabine plus efficace que le 5-fluorouracile (Burris et al., 1997). Néanmoins, la gemcitabine utilisée seule donne rarement une augmentation de la survie des patients et le problème de résistance dans ce cancer est important. Des études cliniques ont permis de découvrir de nouvelles combinaisons entre la gemcitabine et d'autres composés afin de diminuer la chimiorésistance et la toxicité ainsi que d'augmenter l'efficacité du traitement. On peut citer comme exemples approuvés par la FDA, l'association avec l'erlotinib (un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase de l'EGFR (epidermal growth factor receptor)) ou un autre agent chimiothérapique, l'Abraxane. Une autre association gemcitabine/cisplatine semble plus efficace mais sans différence statistique (Heinemann et al., 2006). La combinaison gemcitabine/oxaliplatine est utilisée pour des patients dont la tumeur est chimiorésistante à la gemcitabine seule ou après une rechute (Demols et al., 2006). Dans les années 2000, la combinaison FOLFIRINOX est devenue le traitement de référence. Malheureusement, sa toxicité est très élevée mais des études sont en cours pour modifier les composés pour la rendre moins toxique (Adamska et al., 2017). L'association entre la gemcitabine et le nab-paclitaxel a présenté des résultats prometteurs comparés à ceux de la gemcitabine seule dans une étude clinique de phase III en 2013 (Von Hoff et al., 2013).

La chimiothérapie de seconde ligne est administrée à la suite d'une chimiothérapie de première ligne dont les résultats ont été jugés insuffisants, ou lors de récurrence. Les options sont limitées (généralement des chimiothérapies à base d'oxaliplatine) et dépendent de l'état de santé du patient. Des traitements améliorant la qualité de vie en traitant les

symptômes sont également entrepris. Il s'agit de traitements palliatifs pour diminuer la douleur ou aider le patient à s'alimenter. Il est possible également de poser une prothèse biliaire pour faciliter la circulation de la bile ou duodénale pour aider au transit des aliments (Adamska et al., 2017).

C. Nouvelles thérapies

Les apports de la recherche sur la compréhension de l'ACP permettent, en plus d'améliorer les traitements existants, de développer des nouvelles thérapies ciblées. Ces stratégies ciblent par exemple la voie du récepteur aux facteurs de croissance EGFR suractivée dans le cancer du pancréas ou les différentes voies de signalisation altérées suite à la mutation de l'oncogène Kras décrite dans la majorité des cancers du pancréas.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un mécanisme nécessaire à la croissance tumorale et à la dissémination des métastases. Des thérapies ciblent ce mécanisme et plus particulièrement le facteur de croissance vasculaire VEGF (vascular endothelial growth factor) et ses récepteurs. Récemment, d'autres thérapies ciblent les cellules du stroma tumoral qui ont un rôle dans la progression des cellules cancéreuses. Néanmoins, le fait de modifier le stroma pourrait entraîner un échappement des cellules tumorales hors de la tumeur primaire facilitant la dissémination métastatique (Falasca et al., 2016). Des études cliniques en cours utilisent l'immunothérapie afin d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale. On peut citer comme exemple un essai de phase I, débuté en octobre 2017, qui utilise des lymphocytes T du patient, modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur antigénique chimérique, leur permettant de cibler spécifiquement les cellules tumorales.

Le ciblage des microRNA donne des résultats prometteurs sur modèle cellulaire mais il est nécessaire de faire des études cliniques pour évaluer l'efficacité et les effets indésirables chez l'Homme (Adamska et al., 2017). Dans une étude clinique récente de 2017, un inhibiteur du canal ionique TRPV6, SOR-C13, est utilisé dans le traitement de plusieurs tumeurs solides agressives, la meilleure réponse obtenue étant dans le cas de tumeur du pancréas (Fu et al., 2017).

2.5. La progression de l'ACP : des lésions précancéreuses jusqu'au stade métastatique

A. Etapes cellulaires

Il existe 3 types de lésions précancéreuses du pancréas : les néoplasies pancréatiques intraépithéliales invasives (PanINs), les néoplasies intraductales papillaires mucineuses (IPMNs) et les cystadénomes mucineux (MCNs). Les MCNs et les IPMNs sont des lésions macroscopiques facilement visualisables par les techniques d'imagerie. Lors de la détection de ces lésions sous leur forme non-invasive, le pronostic est meilleur et la chirurgie généralement possible (Delpu et al., 2011). Les IPMNs peuvent occasionnellement être détectées sous la forme de lésions kystiques du pancréas ou entraîner une dilatation du canal de Wirsung. Les PanINs sont des lésions se développant au sein de petites ramifications des canaux pancréatiques et sont donc difficilement détectables par les techniques d'imagerie actuelles (Bochatay et al., 2014). La progression de l'ACP s'effectue majoritairement à partir des lésions PanINs (> 90 %). L'origine cellulaire de ces lésions est toujours discutée et peut être attribuée aux cellules canalaire d'où le terme d'adénocarcinome canalaire mais aussi aux cellules acineuses (Lee et al., 2018). Les cellules acineuses sont capables de trans-différenciation et de posséder des caractéristiques canalaire dans un contexte inflammatoire (Guerra et al., 2007, Kopp et al., 2012).

La progression, s'effectuant en plusieurs étapes, se caractérise par une désorganisation de plus en plus importante de l'épithélium avec accumulation progressive d'atypies cytologiques architecturales et de mutations. La première étape est un stade précancéreux appelé néoplasie intra-épithéliale de type 1 (PanIN-1). Cette lésion se caractérise par une augmentation du volume tissulaire (hyperplasie) due à la multiplication d'une cellule ayant subi des mutations génétiques conduisant à sa prolifération incontrôlée. Ensuite, la masse de cellules va entraîner une dysplasie qui est une modification importante de l'architecture tissulaire. Concernant la nomenclature, une dysplasie de grade intermédiaire correspond au stade PanIN-2 et une dysplasie sévère correspondant à un haut grade PanIN-3. Le stade suivant est le cancer *in situ* où la tumeur primaire est bien développée entraînant l'apparition des premiers signes cliniques. La dernière étape est le cancer invasif où les cellules malignes acquièrent la capacité d'invasion leur permettant de franchir la membrane basale, de disséminer dans le mésenchyme pour atteindre la circulation et former des métastases dans des organes distants (**Figure 7**).

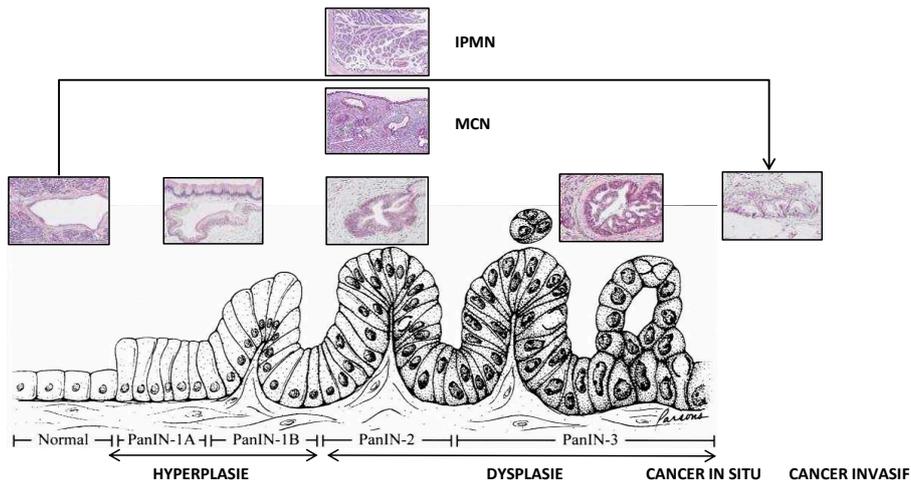


Figure 7 : Progression de l'ACP.

L'ACP peut se développer à partir de trois lésions précancéreuses : les néoplasies pancréatiques intraépithéliales invasives (PanINs) majoritairement, les néoplasies intraductales papillaires mucineuses (IPMNs) et les cystadénomes mucineux (MCNs). Les étapes conduisant au cancer invasif sont : la néoplasie intra-épithéliale de type 1 (PanIN-1), la dysplasie de grade intermédiaire (PanIN-2) sévère (PanIN-3) et le cancer in situ (Modifié d'après Bardeesy et al., 2002, Hruban et al., 2000).

B. Bases moléculaires

La progression du cancer est possible grâce à l'accumulation d'altérations génétiques qui vont notamment activer des oncogènes ou désactiver des gènes suppresseurs de tumeurs, dont les plus connus dans l'ACP sont présentés sur la **figure 8**. Ces altérations peuvent être héréditaires dans 10 % des cas (Becker et al., 2014).

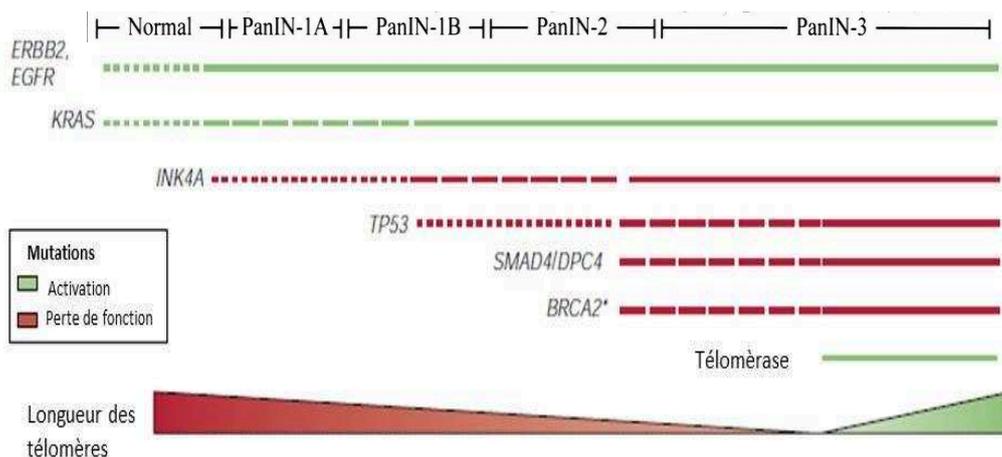


Figure 8 : Mutations associées à la progression de l'ACP.

Dans l'ACP, des mutations activatrices d'oncogènes (en vert) dont l'altération Kras (95 % des ACP) et des mutations perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur (en rouge) sont détectés. L'épaisseur de la ligne correspond à la fréquence de la mutation. L'apparition de ces mutations est favorisée par l'instabilité génétique due au raccourcissement des télomères (Bardeesy et al., 2002).

Ces mutations vont entraîner une surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance tels que l'EGFR de manière précoce et ainsi perturber les voies de contrôle de la prolifération cellulaire permettant la progression tumorale. L'activation de la prolifération par la voie de l'EGFR peut également être le résultat de boucle de rétrocontrôle positive impliquant l'oncogène ras muté (Bardeesy et al., 2002).

95 % des cellules cancéreuses pancréatiques portent des mutations sur l'oncogène ras, les plus fréquentes étant les altérations Kras (*Kirsten rat sarcoma*). Ces altérations sont des mutations ponctuelles qui vont affecter plusieurs résidus : la glycine 12 majoritairement (> 90 %) puis la glycine 13 ou la glutamine 61. Ces mutations vont permettre l'activation permanente d'une petite GTPase en empêchant son interaction avec ses inhibiteurs ou en stimulant son activité GTPasique (Lohr et al., 2005). Cette enzyme est impliquée notamment dans l'activation de plusieurs voies de signalisation majeures qui peuvent interagir entre elles en faveur de la progression tumorale (**Figure 9**). Les mécanismes perturbés à la suite de mutations Kras sont divers : modification de la composition en facteur protumoraux du microenvironnement conduisant à la réaction inflammatoire et l'angiogenèse ou la formation des métastases en agissant sur la prolifération, l'invasion ou le métabolisme des cellules cancéreuses (Jonckheere et al., 2017).

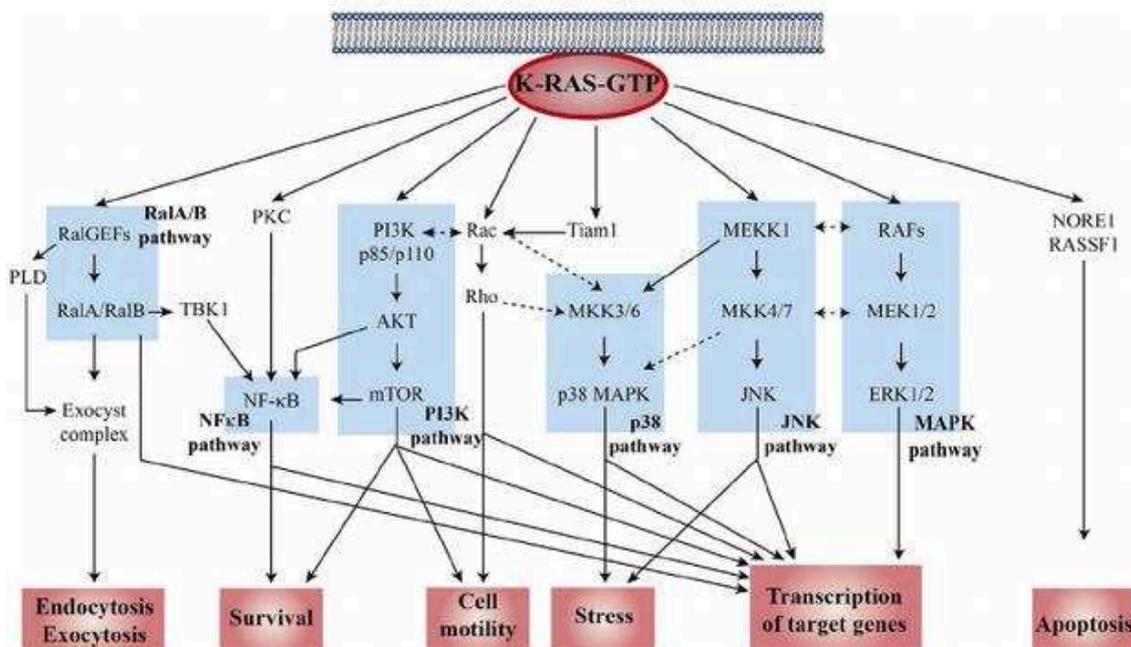


Figure 9 : Principales voies de signalisation impliquant l'oncogène Kras (Jonckheere et al., 2017).

La mutation Kras est l'évènement initiateur le plus précoce de ce cancer mais elle ne permet pas à elle seule la progression de la maladie (Eser et al., 2014). Une autre étude divergente montre que, dans les cellules épithéliales non-cancéreuses HPNE, la mutation Kras active les mécanismes permettant la dissémination des cellules cancéreuses démontrant un rôle crucial de cette mutation (Neel et al., 2012).

Parallèlement, les gènes suppresseurs de tumeur vont subir des mutations inactivatrices. La plus retrouvée dans l'ACP est la mutation d'INK4A. Ce gène code pour la protéine p16 appartenant à la famille des inhibiteurs de kinase dépendante des cyclines. L'inactivation de cette protéine va permettre une progression de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Le gène p53, suppresseur de tumeur, est inactivé dans plus de 50 % des cas d'ACP. Ses mutations entraînent une perte de sa fonction qui dans une situation de stress cellulaire permet notamment l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Dans 30 % des cas, un autre gène suppresseur de tumeur, SMAD4/DPC4 est muté. Ce facteur de transcription contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la voie du TGF β (transforming growth factor β) (Bardeesy et al., 2002).

L'accumulation des anomalies génétiques est stimulée dans les stades précoces par des réarrangements plus importants entre les chromosomes non protégés par les télomères. Les télomères sont des séquences d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes et synthétisées par la télomérase. A des stades tardifs, la réactivation de cette enzyme est cruciale pour l'immortalisation des cellules cancéreuses (Bardeesy et al., 2002).

Les mutations génétiques vont toucher plus d'une dizaine de voies ou de mécanismes différents résumés sur la **figure 10**. Les progrès en matière d'analyse de génome à grande échelle permettent de faire émerger de nouveaux gènes altérés. Certains de ces gènes étaient initialement impliqués dans des mécanismes tels que le remodelage de la chromatine ou la migration des neurones et leur positionnement durant l'embryogenèse, mécanisme appelé guidage de l'axone. Les altérations génétiques impliquées dans l'apparition du cancer sont définies et en constante évolution. Néanmoins, les mutations entre le cancer *in situ* et invasif, régulant la capacité des cellules cancéreuses à disséminer, sont peu connues (Yachida et al., 2013). Il est important de connaître ces altérations génétiques conduisant au phénotype invasif car la moitié des patients atteints d'ACP présentent des métastases (Adamska et al., 2017). En plus des altérations génétiques, il est possible d'observer également l'expression aberrante de certaines protéines dans ce cancer.

Par exemple, une étude récente montre une surexpression de la protéine canal TRPM7 dans les tissus malins en corrélation avec le grade de la tumeur (Yee et al., 2015).

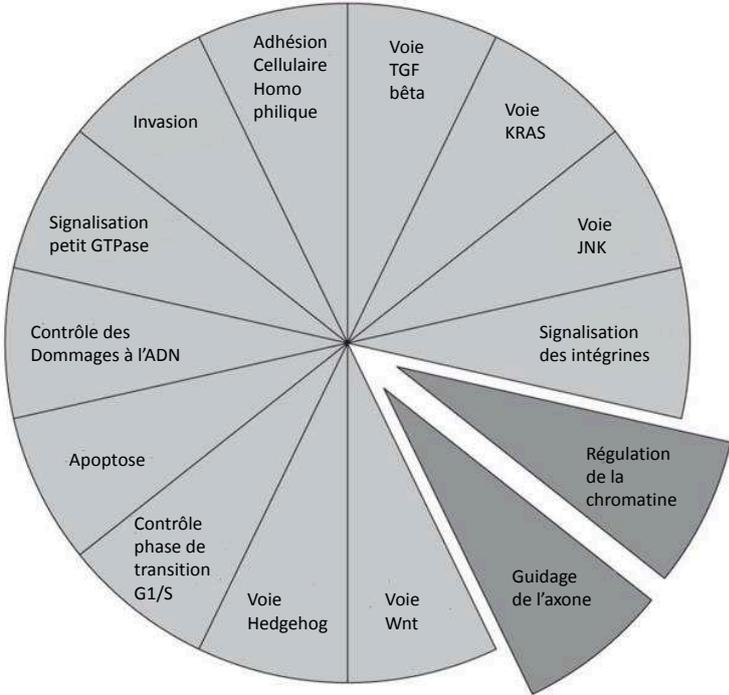


Figure 10 : Voies ou mécanismes connus ou émergents altérés dans la progression de l'ACP (Yachida et al., 2013).

PARTIE 2 : LA CASCADE METASTATIQUE

1. GENERALITES

La cascade métastatique est un processus comprenant plusieurs étapes qui vont permettre la propagation du cancer. Une métastase est une tumeur formée à partir de cellules cancéreuses qui se sont détachées de la tumeur primitive, qui ont migré et se sont installées dans une autre partie du corps (INCA, 2017). La formation de métastases fait partie des capacités communes des cellules cancéreuses (hallmarks of cancer) acquises au fil de l'instabilité génétique (**Figure 11**). Ces capacités permettent aux cellules cancéreuses de surmonter les barrières mises en place par l'organisme pour se défendre contre l'apparition d'un cancer, son développement et la formation des métastases. En clinique, la formation des métastases représente la cause principale de décès par cancer (90 %) démontrant son intérêt comme cible thérapeutique (Sporn 1996).

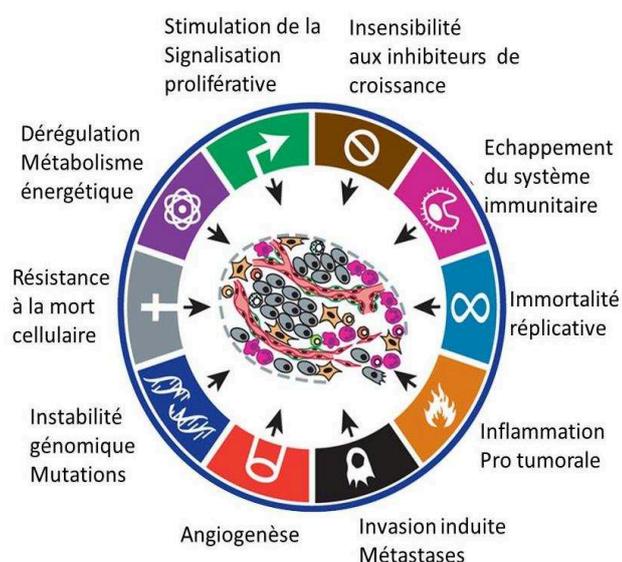


Figure 11 : Hallmarks of cancer
(Hanahan et al., 2011).

2. THEORIES D'ACQUISITION DE LA CAPACITE METASTATIQUE

L'acquisition la capacité métastatique repose historiquement sur deux modèles génétiques : la théorie clonale et adaptative. La théorie clonale stipule que les cellules métastatiques proviennent d'une sous population cellulaire présente initialement dans la tumeur primaire

(Fidler et al., 1977, Hill et al., 1984). La population de cellules métastatiques présente des altérations génétiques similaires à celles de la tumeur primaire. Des gènes ont été découverts perturbant spécifiquement la capacité métastatique sans diminuer la croissance tumorale mais leur valeur pronostic est toujours débattue (Steeg 2003).

Il a été démontré que les cellules issues de la tumeur primaire peuvent se disséminer dans l'organisme de manière très précoce, ce qui a amené à l'élaboration d'un modèle alternatif non-clonal. Dans cette théorie, la cellule ayant une capacité métastatique va se séparer précocement de la tumeur et évoluer de manière parallèle (Gray 2003). Les cellules métastatiques peuvent être différentes des cellules de la tumeur primaire au niveau de leurs altérations génétiques (Schmidt-Kittler et al., 2003). Cette évolution parallèle pourrait par exemple être induite par l'interaction bidirectionnelle entre le microenvironnement et les cellules cancéreuses (Karnoub et al., 2007). L'hétérogénéité tumorale étant très complexe, il est possible que ces deux modèles coexistent dans des tumeurs soumises à des fortes pressions de sélection ou en réponse à des thérapies (McGranahan et al., 2017, Talmadge 2007). Dans l'ACP, le modèle d'évolution parallèle est observé. La probabilité de former des métastases est très élevée (94 %) pour une tumeur de faible taille (3 cm) (Haeno et al., 2012). Une étude *in vivo*, marquant les cellules cancéreuses pour suivre leur progression, montre qu'elles pénètrent dans la circulation sanguine et sont retrouvées dans le foie avant même que la tumeur primaire puisse être détectée par une analyse histologique (Rhim et al., 2012).

D'autres modèles s'inspirant de ce modèle adaptatif ont été proposés. Le modèle d'hétérogénéité dynamique énonce que la capacité métastatique de la tumeur dépend du nombre de cellules ayant acquis ce phénotype transitoire (Hill et al., 1984). Le modèle de la dominance clonale énonce que le clone métastatique émergent dans la tumeur est amené à devenir la population cellulaire dominante dans la tumeur primaire et dans les métastases (Kerbel et al., 1988). Un autre modèle propose que seule une population spécifique rare de cellules souches cancéreuses possède la capacité à former des métastases (Li et al., 2007) **(Figure 12)**.

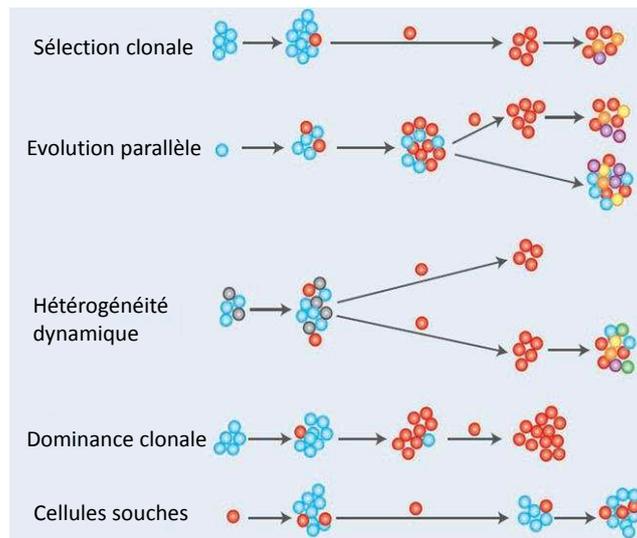


Figure 12 : Modèles d'acquisition de la capacité métastatique

Le modèle de sélection clonale suggère que les cellules métastatiques proviennent d'une sous population cellulaire présente initialement dans la tumeur primaire. Dans le modèle d'évolution parallèle, il est suggéré que la cellule ayant une capacité métastatique va se séparer de manière précoce de la tumeur et évoluer indépendamment des cellules tumorales du site primaire. Le modèle d'hétérogénéité dynamique suggère que la capacité métastatique de la tumeur dépend du nombre de cellules ayant acquis ce phénotype transitoire. Le modèle de la dominance clonale suggère que les sous-clones métastatiques deviennent prédominant dans la tumeur primitive et les métastases. Dans le modèle des cellules souches, il est suggéré que seules les cellules souches, et non la majorité des cellules tumorales, ont la capacité de former des tumeurs secondaires (Talmadge 2007).

3. EVENEMENTS CELLULAIRES DE LA CASCADE METASTATIQUE

La cascade métastatique est un processus qui permet à la cellule cancéreuse de s'éloigner de la tumeur primaire. Cet éloignement n'est possible que si la cellule modifie son adhésion. L'adhésion préserve la polarité apico-basale et les contacts entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC) indispensables à l'architecture des tissus épithéliaux. Les contacts entre cellules voisines s'effectuent *via* différents types de jonctions (serrées et desmosomes). Les jonctions d'ancrage à la MEC sont principalement formées par des glycoprotéines transmembranaires, les intégrines. La perte d'adhésion est la conséquence de modifications d'expression de différentes protéines au cours de transitions phénotypiques des cellules.

3.1. Les différents types de transition

Il existe plusieurs transitions phénotypiques possibles permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir une capacité de mouvement (**Figure 13**) :

- la transition de cellules mésenchymateuses individualisées vers un phénotype amiboïde (MAT).
- la transition de cellules maintenues en clusters vers un phénotype amiboïde (CAT).
- la transition de cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux (EMT).

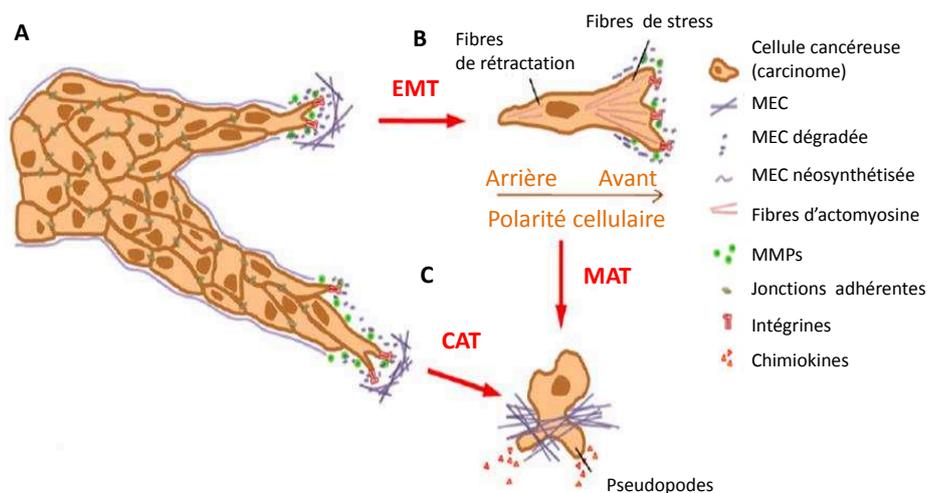


Figure 13: Les différentes transitions permettant l'acquisition d'une mobilité cellulaire.

A. Lors de l'invasion collective, la cellule tumorale située au niveau du front d'invasion exerce une force motrice en favorisant les adhérences focales et le réarrangement de la matrice extracellulaire (MEC) par la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMPs). Les cellules en arrière du front d'invasion conservent leurs caractéristiques épithéliales. B. L'EMT (Epithelial-Mesenchymal transition) permet l'acquisition d'une mobilité dépendante de la dégradation de la matrice extracellulaire par une cellule détachée de la tumeur primaire. C. La CAT (collective-to-amoeboïd transition) et la MAT (Mesenchymal to amoeboïd transition) permettent une migration par déformation du cytosquelette indépendante de la dégradation de la matrice extracellulaire (van Zijl et al., 2011).

La MAT et la CAT sont indépendantes des enzymes dégradant la matrice. La cellule évolue en effectuant des mouvements amiboïdes, par déformation du cytosquelette. Il existe plusieurs types d'EMT : l'EMT de type 1 est impliquée dans les processus physiologiques de formation des trois feuillets embryonnaires (gastrulation) et de la crête neurale chez les vertébrés. L'EMT de type 2 est impliquée dans les mécanismes de réparation tissulaire physiologiques tels que l'inflammation et la fibrose. L'EMT de type 3 contribue à la dissémination métastatique en permettant aux cellules cancéreuses de dégrader et franchir de manière précoce la membrane basale délimitant les épithéliums et d'envahir le stroma, mécanisme appelé l'invasion cellulaire (**Figure 14**). Ce mécanisme est augmenté suite à une pancréatite

qui est le plus fréquent facteur de risque dans l'ACP (Rhim et al., 2012). L'EMT est également impliqué dans la chimiorésistance importante de l'ACP (Wang et al., 2017).

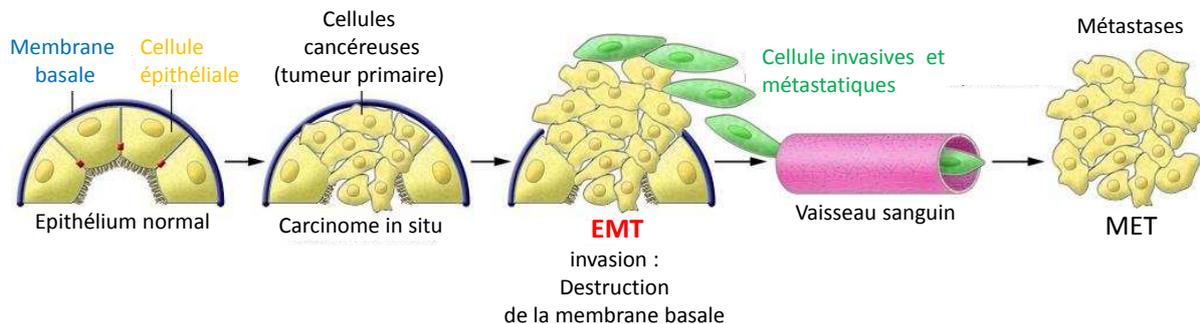


Figure 14 : Contribution de l'EMT à la progression tumorale

La progression d'un épithélium normal vers un carcinome invasif passe par plusieurs étapes. Tout d'abord, les cellules épithéliales perdent leur polarité et se détachent de la membrane basale. La progression vers le cancer métastatique implique l'EMT, permettant aux cellules cancéreuses d'entrer dans la circulation sanguine et d'en sortir pour rejoindre un site distant, où ils peuvent former des micro et macro-métastases, ce qui peut impliquer la MET et un retour à un phénotype épithélial (Kalluri et al., 2009).

Un des événements majeurs de l'EMT est la diminution des marqueurs épithéliaux en parallèle de l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux. Le marqueur épithélial majeur est l'E-cadhérine qui est la principale molécule d'adhésion dans les cellules épithéliales. La perte d'expression de ce marqueur s'effectue grâce à l'activation de Smad par le TGF- β . Smad va ensuite activer les répresseurs transcriptionnels tels que Snail, Slug ou Twist. Cette diminution d'expression va permettre la libération de l'E-cadhérine de son partenaire la β -caténine qui va pouvoir transloquer dans le noyau. La β -caténine va augmenter l'expression de gènes codant des marqueurs mésenchymateux, comme la N-cadhérine ou la vimentine. Les marqueurs mésenchymateux coopèrent avec les molécules matricielles et des protéines des points d'adhésion entre la MEC et les cellules (appelée plaque d'adhésion focale) afin de modifier le comportement cellulaire (Cavallaro et al., 2004). Par exemple, le complexe intégrine $\alpha2\beta1$, N-cadhérine et le collagène de type I va réguler l'invasion alors que le complexe E-cadhérine et intégrine $\alpha2\beta1$ régule l'adhésion cellulaire (Siret et al., 2015). Ce réseau de protéines à l'interface entre la cellule et la MEC comprend plus de 180 membres. Au niveau cytosolique, les kinases FAK et Src vont transduire le signal et entraîner des changements de conformation du cytosquelette permettant l'activation de voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse. L'ACP est caractérisé par une forte réaction desmoplasique. Cette réaction entraîne notamment une

augmentation de la sécrétion des protéines matricielles augmentant la rigidité de la MEC tumorale. La rigidité de la matrice va également participer à la modification du phénotype cellulaire (**Figure 15**). L'implication des canaux dans la modification des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse, notamment la modification d'expression des cadhérines, est déjà décrite dans la littérature. On peut citer comme exemple les canaux Orai 1 dans les cellules cancéreuses gastriques ou TRPM7 dans le cancer de la prostate (Sun et al., 2014, Xia et al., 2016).

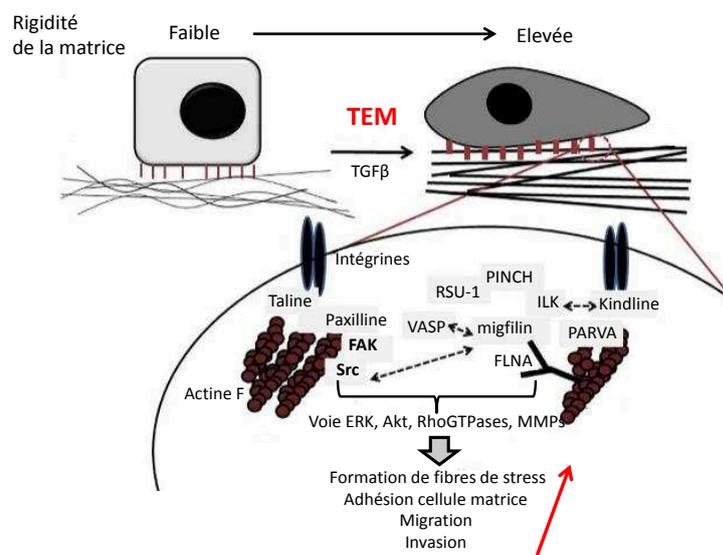


Figure 15 : Interactions protéiques dans les sites d'adhésion focaux des cellules cancéreuses.

Les marqueurs mésenchymateux coopèrent avec des protéines des points d'adhésion à la matrice extracellulaire, notamment les intégrines, afin d'activer des signalisations cellulaires impliquées dans la progression tumorale (Gkretsi et al., 2018).

3.2. Les étapes de formation des métastases

Il existe de nombreux obstacles à surmonter pour qu'une cellule tumorale soit capable de former une métastase. Les mécanismes anti-tumoraux intrinsèques ou les barrières liées au microenvironnement local (chimiques, physiques ou biologiques) vont sélectionner les cellules plus agressives capables de résister et de potentiellement former les métastases (Gupta et al., 2006). Ensuite, la cellule cancéreuse va devoir effectuer plusieurs étapes successives pour atteindre les sites distants où elle va former une métastase, d'où le terme de cascade métastatique. Ce processus comprend une invasion locale des cellules tumorales dans le tissu adjacent, la pénétration et la survie des cellules au sein du système sanguin et lymphatique (intravasation) puis leur sortie (extravasation) et la colonisation des tissus

distants dans des organes précis (Mina et al., 2011). Selon l'organe où s'est développée la tumeur primaire, les métastases vont se développer dans des organes préférentiels (théorie « seed and soil » décrite en 1889 par Paget S.). Par exemple, les métastases seront localisées plutôt dans le foie en cas d'ACP. Toutes ces étapes à franchir font du développement des métastases un événement rare. En effet, seul 0,1 % des cellules ayant quitté la tumeur primaire vont former des métastases qui, malgré ce faible pourcentage, sont retrouvées chez la moitié des patients atteints d'ACP (Adamska et al., 2017). Après avoir franchi toutes ces étapes, il peut y avoir une période de latence plus ou moins longue appelée dormance entre le moment où les cellules métastatiques ont atteint l'organe distant et où elles vont former des métastases cliniquement détectables (van Zijl et al., 2011) (**Figure 16**).

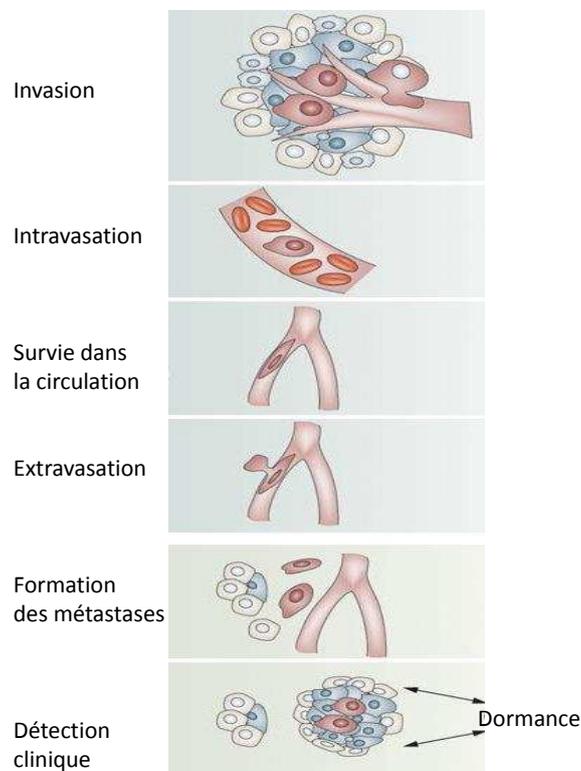


Figure 16 : Etapes principales de la cascade métastatique
(Mina et al., 2011).

3.3. Un mécanisme clé : l'invasion cellulaire

A. Les protéases : effectrices de l'invasion cellulaire

L'invasion est possible grâce à l'expression de protéines qui vont dégrader l'environnement autour de la cellule cancéreuse (membrane basale et MEC) appelées protéases. Les analyses transcriptomiques ont permis l'identification du dégradome qui regroupe toutes les protéases connues à ce jour. Il regroupe 569 protéases divisées en cinq classes selon le

résidu gouvernant leur activité catalytique (Puente et al., 2003, Quesada et al., 2009). Les protéases impliquées dans l'invasion des cellules cancéreuses sont présentées dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Protéases impliquées dans l'invasion cellulaire cancéreuse
(Modifié d'après Choi et al., 2012).

Protéases		Localisation cellulaire
Cystéine cathépsine	K	Intracellulaire (lysosomes) / Extracellulaire
	B	Intracellulaire (lysosomes) / Extracellulaire Péricellulaire
	L	Intracellulaire (lysosomes)
Aspartique cathépsine	E	Organites intracellulaires
	D	Lysosome
Kallikréines	hK1	Intracellulaire / Extracellulaire
	hK3	
	hK10	
	kH15	
Sérine protéase	uPA/uPAR	Membranaire / Péricellulaire
Métalloprotéase matricielle (MMPs)	MMP-14	Membranaire
	MMP-1, 8,13	Extracellulaire
	MMP-2, 9	

B. La famille des métalloprotéases matricielles (MMPs)

Parmi toutes ces familles de protéases, la plus étudiée depuis plusieurs décennies dans la capacité d'invasion est la famille des MMPs (Choi et al., 2012). Il est démontré une corrélation positive entre l'expression des MMPs et le potentiel invasif des cellules tumorales dans de nombreux cancers (Bourboulia et al., 2010). Un inhibiteur physiologique des MMPs, TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2) est suffisant pour diminuer la formation des métastases suite à l'injection *in vivo* de cellules cancéreuses de mélanome, démontrant le rôle important des MMPs dans la cascade métastatique (Schultz et al., 1988). Dans les tumeurs primaires pancréatiques et les métastases, des études

immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* démontrent une surexpression de plusieurs MMPs comparées aux tissus sains, ce qui montre que les MMPs auraient un rôle fonctionnel dans l'invasion dans ce cancer (Bramhall 1997, Imamura et al., 1998, Yamamoto et al., 2001). L'expression des ARNm notamment de la MMP-2, 9 et des métalloprotéases membranaires est reliée au développement de la réaction desmoplasique qui est importante dans l'ACP (Ellenrieder et al., 2000, Gress et al., 1995). La mutation majeure Kras influe également sur l'expression des MMPs (Fukushima et al., 2001). Des facteurs cliniques tels que l'existence de métastases et les récives sont influencés par l'activité de MMP-2 (Koshiba et al., 1998). Le lien fonctionnel entre les MMPs et les canaux pour réguler l'invasion est décrit dans la littérature dans plusieurs cancers par exemple de la vessie, du sein, le mélanome ou le cancer colorectal (Liu et al., 2013, Macpherson et al., 2014, Sun et al., 2014, Wang et al., 2014).

La famille des métalloprotéases matricielles comprend les MMPs classiques et les MMPs membranaires qui vont permettre un remodelage de la MEC en la dégradant. D'autres groupes moins étudiés composent cette famille : les ADAMTs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) et les ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase, aussi appelées adamalysines) (Malemud 2006). Les ADAMTs comme les MMPs classiques sont des protéases extracellulaires qui vont pouvoir agir sur de nombreux composants matriciels et leurs effets pro- ou antitumoraux vont dépendre des substrats et de leurs interactions (Cal et al., 2015). Les ADAMs sont impliquées dans l'invasion cellulaire mais sans dégrader la matrice. Ces enzymes sont des protéases transmembranaires qui vont cibler les ectodomains des protéines transmembranaires (par exemple des molécules d'adhésion ou des récepteurs aux facteurs de croissance et aux cytokines) (Mullooly et al., 2016).

Les MMPs participent à toutes les étapes de la cascade métastatique. Elles peuvent participer à l'EMT. Par exemple, la MMP-3 peut dégrader l'E-cadhérine (Lochter et al., 1997). Les MMPs vont également permettre de préparer la niche qui est l'endroit où vont se développer les cellules métastatiques. Ces enzymes ont un rôle à toutes les étapes de cette préparation. Tout d'abord, les cellules de la tumeur primaire vont sécréter des exosomes contenant des MMPs dans la circulation sanguine qui vont circuler jusque dans les tissus pré-métastatiques. Ces MMPs vont moduler les composants de la matrice et libérer différents facteurs séquestrés dans la MEC de la niche qui vont diffuser dans la circulation. Ces facteurs

vont pouvoir agir par exemple sur les cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC = bone marrow dendritic cells). Ces cellules vont préparer la niche *via* la sécrétion de MMPs et la rendre favorable à l'établissement et au développement des métastases (**Figure 17**). La dégradation de la matrice extracellulaire permet donc de libérer des facteurs qui vont préparer la niche et soutenir la capacité métastatique grâce notamment à des facteurs pro-angiogénique et pro-prolifératif (Whitelock et al., 1996). Cependant, cette dégradation possède également un rôle inhibiteur sur la néo-vascularisation en libérant des facteurs répresseurs de l'angiogenèse tels que l'angiostatine, l'endostatine et la tumstatine (Santibanez et al., 2018). Enfin, les MMPs sont capables de cliver les liaisons peptidiques internes de la plupart des protéines des membranes basales, de la MEC et des jonctions cellulaires. Cette dégradation permet aux cellules cancéreuses de s'individualiser, de réaliser l'invasion cellulaire puis de s'éloigner de la tumeur primaire.

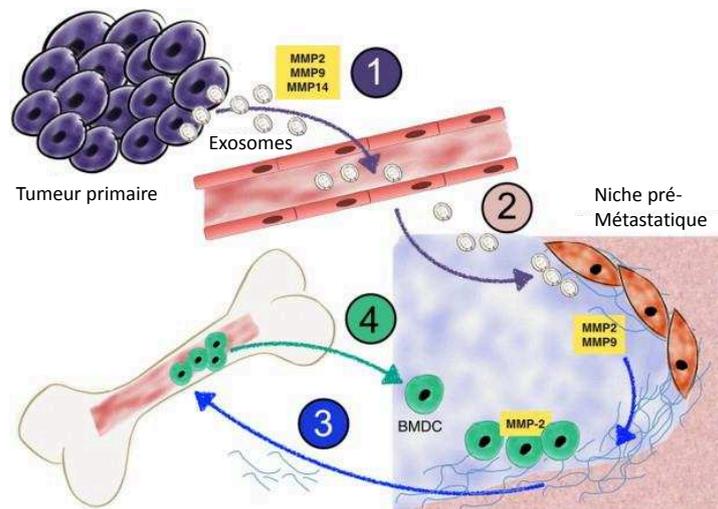


Figure 17 : Implication des MMPs dans la préparation de la niche métastatique.

1. Sécrétion d'exosomes contenant des MMPs. 2. Modelage de la niche par les MMPs. 3. Libération de facteurs de la niche et recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC = bone marrow dendritic cells). 4. Modelage de la niche par les BMDC sécrétant des MMPs (Shay et al., 2015).

a. Structure

Les MMPs sont des endopeptidases Zn^{2+} dépendantes possédant une structure commune : un pro-domaine, un domaine catalytique, une région charnière et un domaine hémopexine. Cette structure présente deux motifs conservés ayant des fonctions importantes : le motif cystéine switch permettant le maintien sous la forme inactive situé dans le pro-domaine (Pro) et le motif liant le Zn^{2+} dans le site catalytique (cat). D'autres domaines moins conservés peuvent être présents : un domaine vitronectine (V), un domaine fibronectine (Fn)

ou un domaine d'homologie avec l'immunoglobuline G (Ig). Les MMPs transmembranaires contiennent une ancre transmembranaire GPI (G) et un domaine transmembranaire de type I ou II (**Figure 18**). Il existe différentes classifications selon le substrat ou la localisation des MMPs (**Tableau 5**).

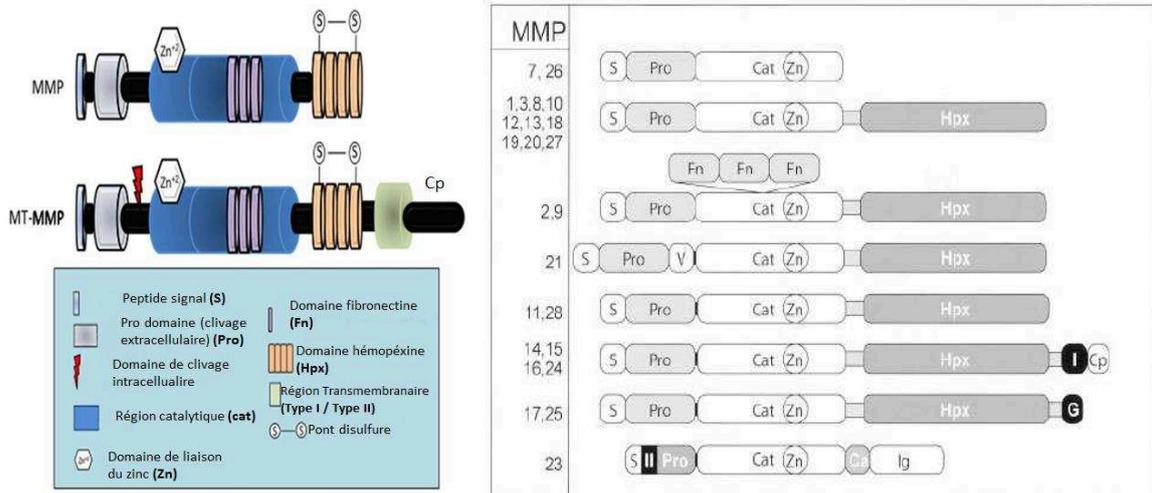


Figure 18 : Structure des MMPs
(Santibanez et al., 2018, Visse et al., 2003).

Tableau 5 : Classifications des MMPs
(Modifié d'après Visse and Nagase 2003).

MMP sécrétées	
MMP1	MMP2
MMP3	MMP7
MMP8	MMP9
MMP10	MMP11
MMP12	MMP13
MMP19	MMP20
MMP21	MMP27
MMP26	MMP28

- Collagénases
(collagène type I, II, III)
- Gélatinases
(gélatine, laminine, collagènes, composants des membranes basales)
- Stromélysines
(composants matriciels)
- Matrylsines
(molécule de surface : Fas L, TNF α , E-cadhérine, composants matriciels)
- Autres MMPs

MMPs transmembranaires		
Type I	Ancre GPI	Type II
MMP14	MMP17	MMP23A
MMP15	MMP25	MMP23B
MMP16		
MMP24		

b. Régulation

Dans les conditions physiologiques sans nécessité de remaniement tissulaire, l'expression constitutive est faible et ne permet pas le stockage de ces enzymes. Toutes les MMPs sont synthétisées sous forme inactive appelée zymogène. Les MMPs vont devoir être secrétées, à l'exception des métalloprotéases transmembranaires, et actives localement dans la MEC pour jouer leur rôle. L'expression, la localisation et l'activation de ces protéases sont régulées à plusieurs niveaux (transcriptionnel, spatial et temporel). Dans le cadre du cancer, il a longtemps été supposé que les MMPs étaient produites seulement par les cellules tumorales mais il a été montré que les cellules du stroma (fibroblastes, macrophages et cellules endothéliales) possèdent également cette capacité et peuvent coopérer avec les cellules tumorales pour induire l'activation des MMPs (Almholt et al., 2003, Basset et al., 1990).

La régulation transcriptionnelle s'effectue grâce à des promoteurs des gènes codant pour les MMPs qui sont sensibles à un panel de stimuli variés tels que le pH, l'hypoxie, les facteurs de croissance, les cytokines inflammatoires (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukine 1 β (IL1 β), les glucocorticoïdes, les rétinoïdes ou encore la modification des contacts intercellulaires et avec la MEC (Saarialho-Kere et al., 1992, Yan et al., 2007). Ces stimuli activent des voies des signalisations diverses aboutissant à l'expression de facteurs de transcriptions activateurs (parmi lesquels on trouve AP1, PEA3, Sp1, la β -caténine, Tcf4 ou encore NF-kB) qui vont se fixer sur leurs séquences cis (Santibanez et al., 2018). Les similarités entre la composition en éléments cis des promoteurs des MMPs permet une régulation commune. Ces similarités permettent de les classer en trois groupes : un groupe présentant dans son promoteur une TATA box (site vers 30 paires de bases (pb)) et un élément AP1 (Activator protein 1) (site vers 70 pb), soit avec la présence d'une TATA box mais sans site AP-1 proximal et enfin un groupe sans ces éléments trans dont l'expression est gouverné par SP1 se fixant sur des boîtes GC (Santibanez et al., 2018). De plus, les gènes peuvent présenter des modifications épigénétiques et leur expression peut être régulée par des microRNAs (Yan et al., 2007).

Pour éviter une diffusion spatiale trop large de ces protéines, celles-ci se localisent dans une structure appelée invadopode. Cette protrusion est formée grâce à une polymérisation intense d'actine au niveau de la face ventrale de la cellule invasive en contact avec la MEC (Kelly et al., 1994). Ces protrusions vont changer de forme, se rassembler ou disparaître pour accompagner le mouvement cellulaire. Le réseau d'actine dans ces structures est composé de deux types de fibres d'orientation différentes : des colonnes de fibres d'actine F perpendiculaires à la matrice d'où émergent d'autres fibres radiales parallèles à la matrice. Autour de ce complexe d'actine est retrouvé un anneau de molécules d'adhésion. Ces anneaux comprennent des récepteurs de composants matriciels (par exemple les intégrines) recrutant de nombreux effecteurs intracellulaires : des tyrosine kinases (Fak, Pyk2, Src, Tsk), de petites GTPases (Rho, Rac, Cdc42) ou des molécules adaptatrices (paxilline, vinculine) (Destaing et al., 2014) (**Figure 19**).

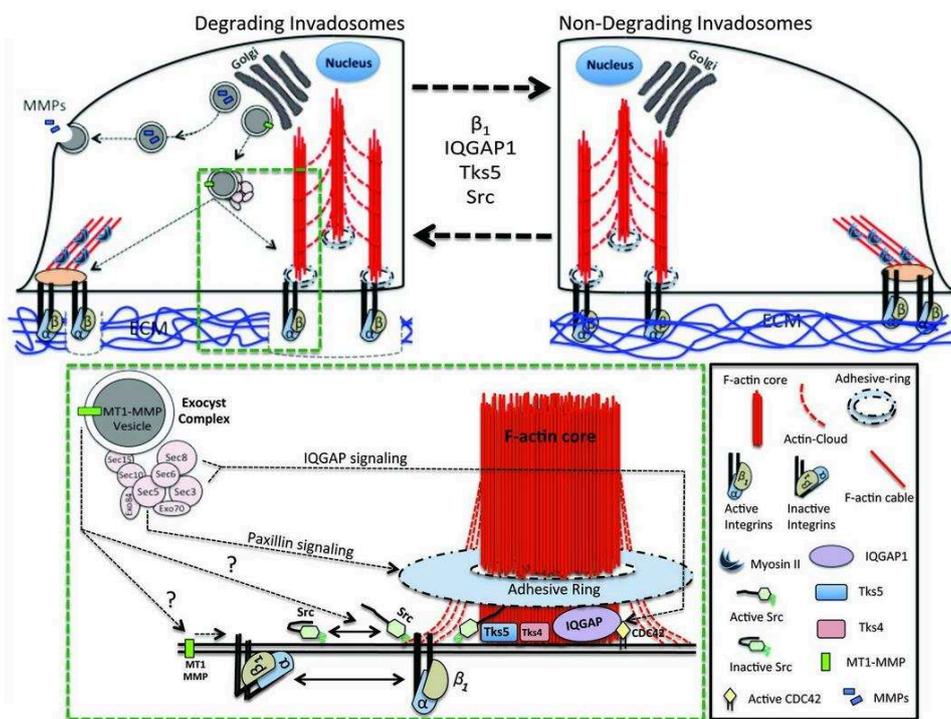


Figure 19 : Structure et composition de l'invadopode.

L'invadopode permet la dégradation localisée de la matrice grâce à la formation d'un réseau de fibres d'actine couplé à des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (Destaing et al., 2014).

La formation des invadopodes est observée *in vitro* mais également *in vivo* et comprend 3 étapes principales (**Figure 20**). Au sein de ces étapes, l'ordre précis des événements moléculaires n'est pas clairement déterminé.

- L'initiation consiste en des modifications du cytosquelette qui vont être stimulées notamment par des facteurs de croissance. Lors de cette phase, la kinase Src transloque au niveau des adhésions focales pour activer Tsk5 et d'autres kinases telles que la PKC (protéine kinase C) ou PI3K (phosphoinositide 3-kinase). L'association de Tsk5 phosphorylée à la cortactine va favoriser la polymérisation de l'actine.
- L'assemblage du cytosquelette en une structure invasive s'effectue grâce à de nombreux acteurs protéiques comme des kinases et la machinerie de polymérisation de l'actine (comprenant WASP, dynamine, Arp2/3 notamment). Les intégrines en se liant à des ligands spécifiques participent à l'assemblage de ces structures qui permettent d'orienter spatialement la dégradation. Par exemple, la liaison de l'intégrine $\beta 1$ à un domaine de la laminine va permettre la phosphorylation de p190 appartenant à la famille des Rho GTPase. Cette phosphorylation activatrice va affecter la machinerie du cytosquelette permettant la formation des protrusions (Buccione et al., 2009).
- La maturation permet d'obtenir une structure stabilisée et protéolytique grâce à la présence de la MT1-MMP (MMP-14) transmembranaire, des MMPs secrétées et des molécules d'adhérence qui ensemble vont permettre une dégradation de la matrice très localisée (Jacob et al., 2015).

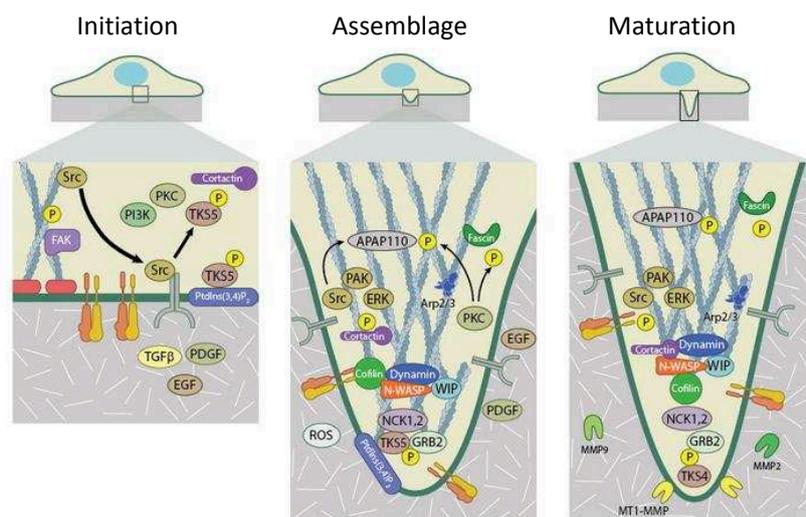


Figure 20 : Etapes de formation de l'invadopode.

Les différentes étapes de formation de l'invadopode (initiation, assemblage, maturation) impliquent notamment la machinerie du cytosquelette et des molécules d'adhérence et permettent la sécrétion localisée des métalloprotéases matricielles (MMPs) (Murphy et al., 2011).

La fonction adhésive est couplée à la dégradation localisée de la matrice extracellulaire. Par exemple, dans les ostéoclastes, l'adhérence est tellement forte qu'elle permet la formation d'une zone étanche limitant la diffusion des protéases (Stenbeck et al., 2000). Dans les cellules de mélanome, l'interaction au niveau de l'invadopode entre le collagène de type I avec deux types d'intégrines $\beta 1$ va activer la séprase gélatinolytique (Mueller et al., 1999). L'intégrine $\alpha\beta 3$ est capable d'interagir avec la MMP-14 afin d'activer la MMP-2 (Hofmann et al., 2000). La MMP-9 se lie au CD44, un récepteur de l'acide hyaluronique, permettant d'activer son activité protéolytique (Yu et al., 1999). Le CD44, partenaire de la MMP-14 transmembranaire, va permettre sa localisation dans l'invadopode régulant ainsi la capacité invasive (Seiki 2003).

Temporellement, l'activité protéolytique de toutes les MMPs est majoritairement régulée par quatre inhibiteurs tissulaires appelés TIMPs (1 à 4) avec des efficacités variables. Ils mimet le substrat en occupant le site enzymatique des MMPs (Arpino et al., 2015, Murphy 2011). Néanmoins, ils peuvent activer les MMPs dans certains cas en partenariat avec d'autres protéines (Itoh et al., 2001). La régulation temporelle comprend également la nécessité pour les MMPs de passer par plusieurs stades avant de devenir active. La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme inactive appelée pré-MMP. Pour être activée, elles perdent leur sous unité S (peptide signal) et deviennent des pro-MMP. Cette conformation pro-MMP est maintenue par une liaison covalente entre les cystéines du pro-domaine en N terminal et le Zn^{2+} du domaine catalytique. La protéolyse est le mode d'activation principal des MMPs. Le clivage entre les deux domaines libère le site catalytique et rend la protéase active. Il peut être effectué en intracellulaire par la furine pour les métalloprotéases membranaires. Pour les MMPs sécrétées, il est effectué par d'autres protéases extracellulaires (autres MMPs ou la plasmine) (Andreasen et al., 2000). L'activation de la plasmine se fait *via* le système activateur du plasminogène. Quatre membres composent ce système : uPA (urokinase plasminogen activator) le ligand, son récepteur, leur interaction permet l'activation du ligand qui convertit le plasminogène en plasmine et l'inhibiteur physiologique d'uPA, PAI1 (plasminogen activator inhibitor-1). L'expression de ces différents acteurs est de mauvais pronostic dans le cancer. L'activité de ce système, conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire, est également modulée par des protéines adhésives telles que les intégrines ou la vitronectine (Santibanez et al., 2018, Smith et al.,

2010) (**Figure 21**). Les conditions physico-chimiques du microenvironnement (pH, hypoxie) influent sur l'activité des MMPs (Jacob et al., 2015, Liou et al., 2010).

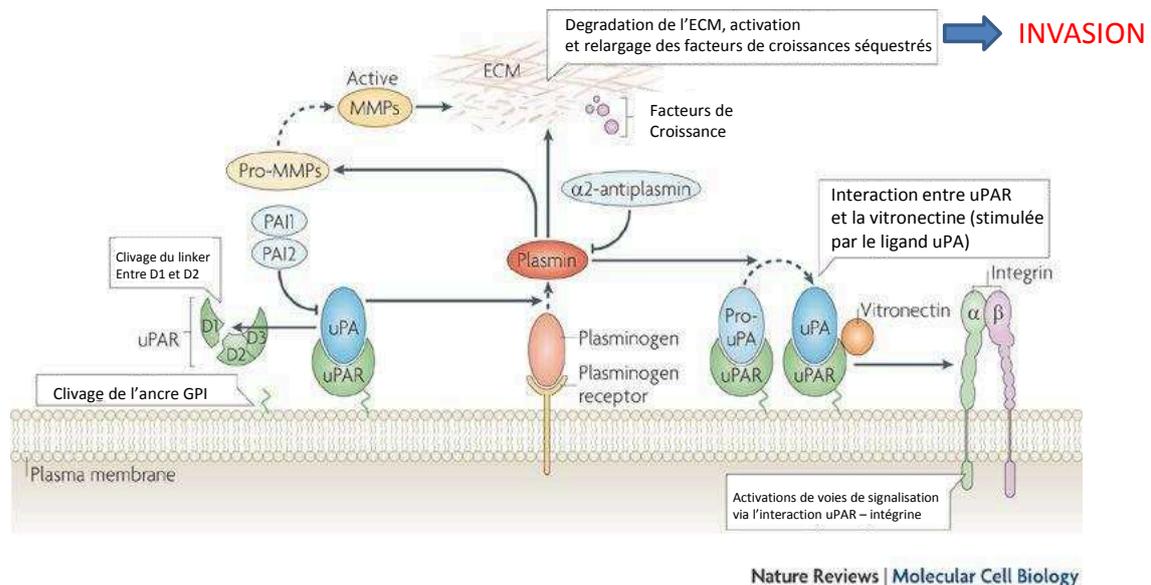


Figure 21 : Acteurs du système activateur du plasminogène.

Le ligand uPA (urokinase plasminogen activator) en se fixant sur son récepteur uPAR permet l'activation de la plasmine qui dégrade directement (ou *via* l'activation des MMPs) la matrice extracellulaire. Des interactions existent entre ce système et des molécules adhésives telles que les intégrines (Smith et al., 2010).

C. La protéine chaperonne Hsp90

Pendant un stress, la quantité de protéines mal conformées augmente (Voellmy 2004). Les protéines chaperonnes Hsp (heat shock protein) sont synthétisées suite à ces stress et vont s'associer à ces protéines pour en éviter l'accumulation au sein des cellules. Au sein de cette famille, la protéine Hsp90 représente, dans les cellules normales, 1-2 % des protéines totales. Elle peut atteindre 4 à 6 % dans les cellules soumises à un stress. Elle possède un spectre d'interaction très large : 10 % du protéome correspondant à environ 2000 protéines et 725 interactions ont été découvertes (Prodromou, 2016). Cette capacité d'interaction élevée fait que cette protéine peut intervenir dans de nombreux processus physiopathologiques et notamment dans le cancer (Echeverria et al., 2011). Hsp90 peut interagir directement avec ses protéines clientes ou indirectement *via* des co-chaperonnes qui vont réguler ses interactions et son cycle d'activation dépendant de l'ATP. L'augmentation de son expression dans les tissus et le plasma est corrélée à l'agressivité cancéreuse, ce qui en fait un bon marqueur pronostic (Barrott et al., 2013).

Peu de données établissent un lien entre l'ACP et Hsp90. Une étude montre que son taux sérique augmente chez les patients atteints d'ACP. Les cellules immunitaires associées à la tumeur seraient responsables de cette sécrétion qui permettrait d'induire l'invasion des cellules épithéliales pancréatiques (Chen et al., 2018). Un lien fonctionnel entre MMP-2 et Hsp90 dans l'invasion est décrit dans un modèle cellulaire d'ACP, notamment *via* la co-chaperonne Hop (Walsh et al., 2011). L'utilisation d'inhibiteurs d'Hsp90 vont perturber le développement des cellules cancéreuses pancréatiques. Par exemple, la withaférine A induit une dégradation ses protéines clientes *in vitro*, l'apoptose et diminue la croissance tumorale *in vivo* (Yu et al., 2010). Le célastrol présente une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* en empêchant l'interaction entre Hsp90 et Cdc37 entraînant la dégradation de protéines clientes (Zhang et al., 2008).

Les interactions fonctionnelles entre les canaux et Hsp90 font l'objet d'étude mais aucune n'est décrite dans le cadre du cancer. Par exemple, dans les cellules embryonnaires rénales HEK 293, Hsp90 interagit avec le canal chlore CIC-2 et module son activité (Hinzpeter et al., 2006). Dans le même modèle cellulaire, la forme α uniquement est capable d'interagir avec le canal potassique hERG et modifier son taux de glycosylation qui influence sa maturation (Peterson et al., 2012). Dans les cellules β pancréatiques, Hsp90 interagit avec le canal potassique sensible à l'ATP et la surexpression de la chaperonne permet l'expression à la membrane du canal sous une forme mutée. Ce canal muté conduit à des anomalies de sécrétion de l'insuline dépendante du potentiel de membrane (Yan et al., 2010).

Actuellement, 13 inhibiteurs d'Hsp90 sont testés en clinique pour traiter le cancer dont la plupart sont en phase I ou II. On peut citer comme exemple, l'IPI-50 qui est un dérivé de la geldanamycine (un des premiers inhibiteurs naturels d'Hsp90). L'IPI-50 a atteint la phase III pour le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales non résécables ou métastatiques mais l'essai clinique a été stoppé prématurément car le traitement entraînait une mortalité trop importante. L'étude cristallographique de la structure d'Hsp90 a permis le développement d'autres inhibiteurs synthétiques de seconde génération comme l'AUY922 testé pour le traitement du cancer du poumon ou STA-9090 pour le cancer du sein métastatique (Sidera et al., 2014).

a. Structure

Hsp90 est une protéine à activité ATPasique contenant trois domaines (**Tableau 6**) :

- le domaine amine (N-terminal) contient la fonction enzymatique et permet la dimérisation transitoire des monomères sous l'effet de la fixation de l'ATP. Ce domaine peut être la cible de drogues inhibitrices d'Hsp90 (geldanamycine, radicicol).
- connecté par un domaine de liaison, le domaine médian contient la boucle catalytique fixant le substrat (γ -phosphate de l'ATP).
- le domaine carboxylique est responsable de la dimérisation stable des monomères. Ce domaine possède également un site alternatif fixant l'ATP et est la cible de drogues anticancéreuses comme la cisplatine ou la novobiocine.

Tableau 6 : Structure d'Hsp90
(Wu et al., 2017).

Numéro des acides aminés	1	210	272	629	732	
Domaines	N terminal		liaison	médian	C terminal	
	N terminal		liaison	médian	C terminal	
Sites de liaison de petites molécules	Nucléotides, Geldanamycine 17AAG, radicicol			γ -phosphate de l'ATP	Nucléotides, Novobiocine Cisplatine	
Fonctions	ATPases, Liaison de co-chaperonnes		Domaine de liaison flexible	Liaison des protéines clientes et co-chaperonnes, activation (activité ATPasique)	Dimérisation Liaison des co-chaperonnes (protéines clientes ?)	

Geldanamycine, 17AAG, radicicol : drogues inhibitrices d'Hsp90

Novobiocine, cisplatine : drogues anticancéreuses

Le cycle d'activation d'Hsp90 est décrit sur la **figure 22**. La fixation de l'ATP sur le domaine médian entraîne des modifications de la conformation lui permettant de devenir active. L'association du domaine médian avec les domaines N-terminaux dimérisés forment l'état fermé actif d'Hsp90. La co-chaperonne Aha1 peut favoriser cet état fermé. Une fois l'ATP transformé en ADP, les domaines N-terminaux se séparent et la protéine est à nouveau en conformation ouverte inactive. L'étape du cycle d'activation dans laquelle se trouve Hsp90 peut influencer sur l'interaction avec ses protéines clientes mais les mécanismes ne sont pas totalement élucidés.

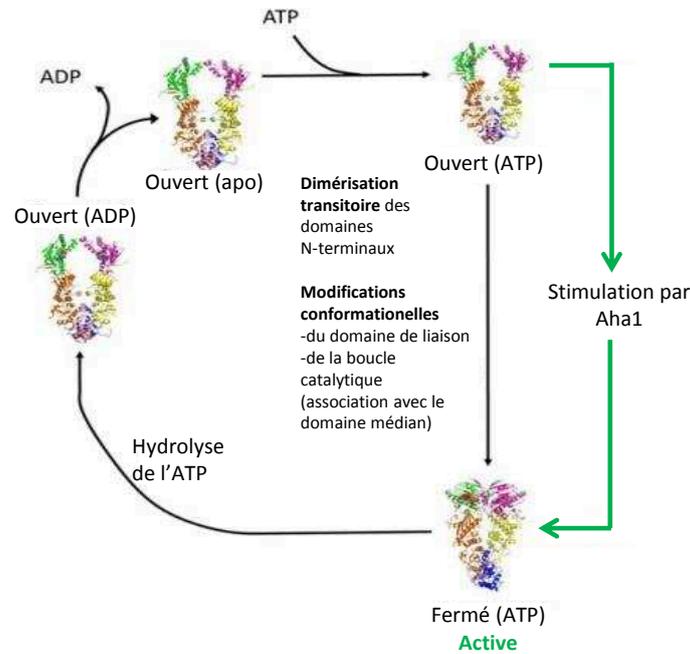


Figure 22 : Cycle d'activation d'Hsp90
(Prodromou, 2016, Wu et al., 2017).

b. Régulation

Il existe trois mécanismes non-exclusifs qui permettent de distinguer Hsp90 dans les cellules cancéreuses et saines : l'induction de l'expression d'Hsp90 dans les cellules cancéreuses, les interactions protéiques et les modifications post-traductionnelles différentes qui vont moduler son activation et sa localisation (**Figure 23**). De plus, les interactions d'Hsp90 avec ses partenaires pourraient être différentes selon les conditions. Dans les cellules stressées, l'association serait plus stable qu'en conditions normales où Hsp90 interagirait avec ses protéines clientes de manière dynamique et dépendante des interactions de faibles affinités entre l'ATP et l'ADP (Barrott et al., 2013). Les cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sont capables également de modifier la structure tertiaire d'Hsp90 d'une association en dimère majoritaire vers une association en oligomères en se fixant sur l'extrémité carboxylique (C-terminal) (Garnier et al., 2002). Plus précisément, le Mg^{2+} stimule la formation de tétramères, d'hexamères ou de décimères. La formation de ces structures est un avantage pour la fonction chaperonne d'Hsp90 (Moullintraffort et al., 2010).

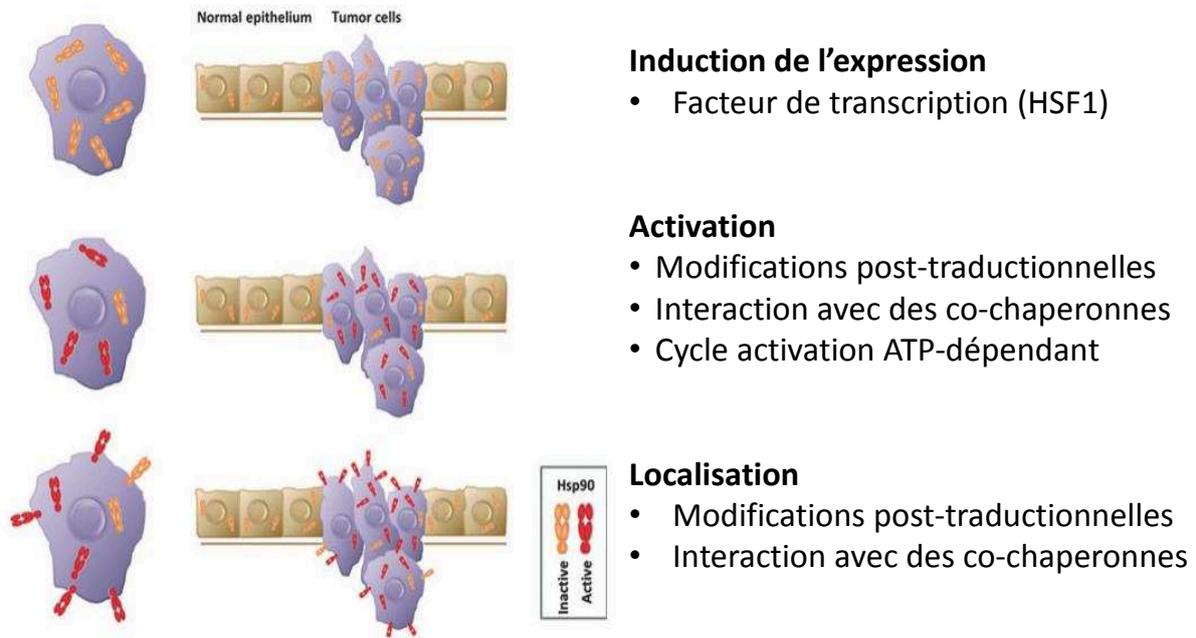


Figure 23 : Mécanismes d'activation d'Hsp90.
(Barrott et al., 2013).

Le principal régulateur transcriptionnel activateur est HSF1 (heat shock factor 1) qui va se fixer sur ses éléments de réponse HSE (heat shock element) dans le promoteur des gènes codant les protéines Hsp90 (Kampinga et al., 2009). HSF1 est séquestré par Hsp90 dans des conditions physiologiques. Lors de conditions de stress, Hsp90 va interagir avec les protéines mal conformées et va libérer HSF1. Pour activer la transcription, deux sérines (230 et 326) de HSF1 doivent être phosphorylées (Boellmann et al., 2004, Holmberg et al., 2001). Ce facteur de transcription va ensuite transloquer dans le noyau. Son activité peut également être régulée par d'autres modifications post-traductionnelles telles que la sumoylation ou l'acétylation. De plus, HSF1 est capable d'interagir avec d'autres régulateurs (complexe ribonucléoprotéique, chaperonne, facteurs de transcription) afin de contrôler l'expression d'Hsp90 (Prodromou, 2016). Cette chaperonne est surexprimé deux à trois fois plus par les cellules cancéreuses comparées aux cellules saines. Cette surexpression est en réponse aux différents stress subis par les cellules cancéreuses qui survivent dans leur micro environnement (hypoxie, absence en facteur de croissance). Plus précisément, les cellules humaines contiennent une forme β constitutivement exprimée et une forme inductible α possédant 86 % d'homologie de séquence environ. Ces différences d'expression sont dues à la structure des promoteurs. Des séquences cis différentes dans le promoteur et les introns

du gène codant la forme α permettent d'augmenter son expression et de la rendre sensible aux stress (Prodromou 2016).

La surexpression d'Hsp90 α seule ne permet pas d'expliquer son rôle oncogénique. En effet, dans certains tissus non pathologiques, Hsp90 est exprimé en plus grande quantité (Barrott et al., 2013). Son activation passe par l'interaction avec des co-chaperonnes qui possèdent diverses fonctions. La co-chaperonne Aha1 joue par exemple sur l'activité ATPasique d'Hsp90 en se fixant sur la boucle catalytique et favorise l'état fermé actif (Meyer et al., 2004). Elles peuvent également modifier la formation de complexes protéiques entre Hsp90 et ses protéines clientes et peuvent avoir une activité enzymatique. Ces activités enzymatiques permettent d'apporter à Hsp90 des modifications post-traductionnelles variées qui vont influencer directement l'activité d'Hsp90 et/ou sa capacité d'interaction (Barrott et al., 2013, Prodromou 2016). Concernant les phosphorylations, il existe de nombreux résidus modifiés par des enzymes non-connues et dont les effets n'ont pas encore été étudiés (Mollapour et al., 2011). De plus, les formes α et β présentant une forte homologie, les modifications post-traductionnelles se font en général sur les deux formes sur des résidus équivalents ou proches. Le **tableau 7** résume les modifications post-traductionnelles rapportées sur la forme α et Hsp90 totale dont les enzymes sont connues.

Tableau 7 : Modifications post traductionnelles d'Hsp90
(Barrott et al., 2013, Prodromou 2016).

Modifications post traductionnelles	Résidus Enzyme	Effet sur Hsp90	Références
acétylation	Lys294 (total) <i>HDAC6</i>	Diminution de l'association avec les protéines clientes	Scroggins et al., 2007
	Lys69, 100, 292 327, 546, 558 <i>P300 (α)</i> <i>HDAC6</i>	Augmentation de l'association avec les inhibiteurs Augmentation la sécrétion Diminution de la liaison des nucléotides à Hsp90	Yang et al., 2008
ubiquitinylation	Lysine 63 <i>Hectd1</i>	Diminution de la sécrétion d'Hsp90α	Sarkar et al., 2012
sumoylation	Lys191 (total)	Augmentation l'association avec Aha1	Mollapour et al., 2014
nitrosylation	Cyst597 – <i>eNOS</i> Ala577	Diminution de la fonction chaperonne et de l'activité	Martinez-Ruiz et al., 2005
phosphorylation	Ser263 (α) <i>B-Raf/MKK/ERK</i>	-	Old et al., 2009
	Ser460(α) - <i>PKA</i>	-	Huang et al., 2007
	Ser231, S263 (α) <i>CK2</i>	-	Lees-Miller et al., 1989
	Ser 391 (α) <i>Pnck</i>	Perturbation de l'activité chaperonne requise pour la dégradation de l'EGFR	Deb et al., 2011
	Thr22 <i>CK2</i>	Diminution de l'activité ATPasique Augmentation des interactions avec les inhibiteurs	Mollapour et al., 2011
	Thr5 / 7 (α) <i>DNA-PK</i>	Augmentation de la sécrétion Augmentation de la localisation dans les sites de réparation des dommages à l'ADN	Quanz et al., 2012
	Thr90 (α) <i>PKA</i>	Augmente la sécrétion Diminue l'interaction avec les protéines clientes	Lei et al., 2007
	Thr725(α) <i>CK1, CK2, GSK3-β</i>	Influence le statut d'interaction avec HOP et CHIP	Muller et al., 2013
	Tyr197 (total) – <i>Yes</i>	Diminution de l'association avec les co-chaperonnes	Xu et al., 2012

Hsp90 est localisée dans le cytoplasme, le noyau mais également retrouvée sur la membrane plasmique des cellules cancéreuses. Elle est également sécrétée dans l'espace extracellulaire par exemple en lien avec l'expression de HIF1 α en condition hypoxique qui est une condition du microenvironnement retrouvée dans environ 40 % des tumeurs humaines (Becker et al., 2004, Li et al., 2012). Certaines modifications post-traductionnelles permettraient de réguler cette sécrétion (**Tableau 7**).

Il a longtemps été considéré que seule Hsp90 α était sécrétée mais il a été décrit récemment que la forme β l'est également et possède un rôle oncogénique mais peu décrit dans la littérature (Barrott et al., 2013). Par exemple, l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* est dépendante d'une interaction extracellulaire entre MMP-3 et Hsp90 β mais le mécanisme précis n'est pas décrit (Correia et al., 2013). Dans une autre étude, l'absence de phosphorylation d'Hsp90 β sur les sérines 226 et 255 entraîne une résistance à l'apoptose induite par le cytochrome c et à la drogue anti-cancéreuse imatinib dans les cellules leucémiques, démontrant un rôle sensibilisateur à la mort cellulaire de cette modification post-traductionnelle d'Hsp90 β (Kurokawa et al., 2008).

Cette localisation extracellulaire permet ainsi de réguler l'invasion cellulaire en interagissant avec de nouvelles protéines clientes (Eustace et al., 2004, Tsutsumi et al., 2007). Hsp90 α extracellulaire est impliquée dans l'EMT des cellules cancéreuses prostatiques et régule leur invasion *via* une voie dépendante des MMP-2 et 9 (Hance et al., 2012). Hsp90 α est capable de stabiliser uPA qui va activer la MMP-2 stimulant l'invasion des cellules de fibrosarcome (Donet et al., 2014). Ces découvertes originales associant la sécrétion d'Hsp90 à la capacité d'invasion des cellules cancéreuses ont permis de prouver son intérêt en tant que cible thérapeutique des cancers agressifs et ont permis le développement de brevets (Sidera et al., 2014).

tPA (Tissue Plasminogen Activator), un autre activateur du plasminogène, interagit avec Hsp90 α dans les exosomes qui constituent la voie de sécrétion de la protéine (McCready et al., 2010). En effet, Hsp90 ne présente pas les caractéristiques classiques des protéines sécrétées et sa sécrétion est résistante au breféldine A, un inhibiteur couramment utilisé pour bloquer la sécrétion dépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Li et al., 2012, Nickel, 2003).

4. DE NOUVEAUX ACTEURS DE L'INVASION CELLULAIRE : LES CANAUX IONIQUES

La cellule animale est constituée d'une bicouche lipidique hydrophobe qui se comporte comme une barrière. Elle ralentit voire empêche la diffusion des molécules insolubles à travers sa structure comme par exemple celle des molécules polaires comprenant des groupements ionisés. Les ions diffusent rapidement à travers la membrane malgré leur faible solubilité dans la bicouche lipidique alors que les membranes artificielles ne contenant pas de protéines y sont quasiment imperméables. C'est donc la composante protéique de la membrane qui rend possible cette diffusion. Les canaux ioniques sont des protéines qui vont traverser la membrane et qui, par leur perméabilité plus ou moins spécifique aux ions, vont permettre leur transport entre le milieu extracellulaire, le compartiment cytoplasmique et les organites intracellulaires.

Le diamètre du pore étant très petit (à peine plus grand que les ions qui doivent les traverser), les molécules plus volumineuses ne peuvent pas pénétrer dans la cellule par le canal ionique. La sélectivité d'un canal est donc la conséquence du diamètre du pore, des surfaces chargées et polaires le constituant qui vont permettre une attraction ou une répulsion des espèces ioniques. Le mouvement d'un ion dépend également des différences de concentration de l'ion et électrique entre l'intérieur et l'extérieur de cellule, appelées gradient électrochimique (Widmanier 2004).

Il existe des canaux perméables seulement aux ions potassium (K^+) ou au sodium (Na^+). D'autres canaux sont plus spécifiques au proton (H^+) ou aux cations divalents notamment le Ca^{2+} comme par exemple les canaux TRP – Transient Receptor Potential) ou SOC (Store Operated Ca^{2+} Channels). Enfin d'autres canaux sont perméables aux anions comme par exemple, le chlorure (Cl^-) (**Figure 24**).

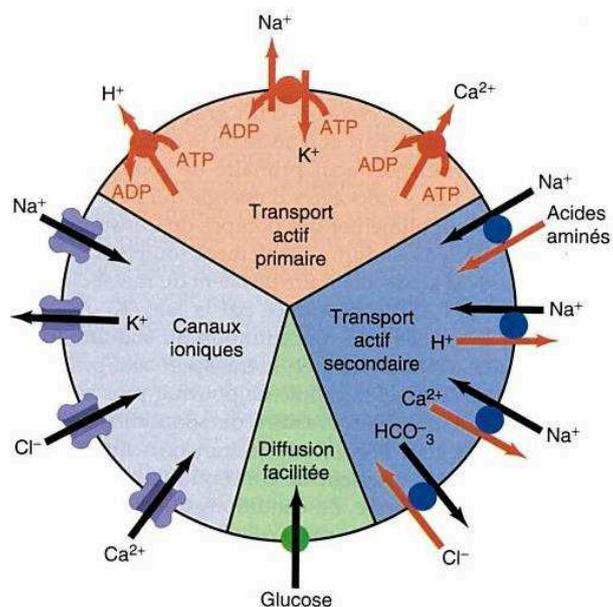


Figure 24 : Protéines membranaires impliqués dans les mouvements de solutés à travers la membrane plasmique (Widmanier 2004).

En plus de ces ions indispensables pour la physiologie cellulaire, les canaux peuvent permettre l'entrée d'ions non indispensables et potentiellement toxiques comme par exemple le nickel (Ni^{2+}) ou le cadmium (Cd^{2+}), qui sont des polluants fréquemment retrouvés dans l'environnement (Tokar et al., 2011). L'ouverture des canaux constitutive ou stimulée va pouvoir modifier les concentrations ioniques entre les différents compartiments. Ces modifications sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques comme la genèse des messages nerveux qui vont influencer le fonctionnement normal du cerveau, du cœur et des muscles squelettiques. Les premières études reliant les canaux ioniques au cancer remontent du début des années 90. Les études fondamentales s'intéressant à la fois aux canaux et aux cancers sont très nombreuses. De plus, les études pharmacologiques ciblant plusieurs types de canaux *in vivo* ont donné des résultats significatifs sur la diminution de taille de la tumeur ou des métastases (Leanza et al., 2016). Cette vision globale de l'état de l'art montre l'importance des canaux dans cette pathologie. Nous nous sommes intéressés à l'invasion cellulaire, un mécanisme précoce de la cascade métastatique. Le **tableau 8** liste les canaux ioniques impliqués dans l'invasion cellulaire *in vitro* et *in vivo* en fonction des cancers.

Tableau 8 : Implication des canaux ioniques dans l'invasion des cellules cancéreuses.

Cancers	Canal (protéine)	Lignées cellulaire	Techniques	Références
Poumon	TMEM16A TRPC6 Nav1.7 P2X7R	GLC82/NCI-H520 A549 H460 A549	Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Métastases	Jia et al., 2015 Yang et al., 2017 Campbell et al., 2013 Jelassi et al., 2011
Colorectal	SK3/Orai1 /STIM1/TRPC1 CaV1.3 TRPC1/Orai1 TRPC5 Nav1.5 SK4 CLIC1 ASIC2 hERG1 hERG Hv1	HCT-116 HCT-116 HT29 SW620/HCT116 Sw60-480, HT29 LoVo / THP-1 LoVo HCT-116, SW480 HT29, SW620 SW480, SW620 H630,HCT116 HEK-293 K562 SW620	Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Métastases Boyden modifié Métastases Boyden modifié	Gueguinou et al., 2016 Gueguinou et al., 2017 Fourbon et al., 2017 Sobradillo et al., 2014 Chen et al., 2017 House et al., 2010 Xu et al., 2014 Wang et al., 2014 Zhou et al., 2017 Lastraioli et al., 2004 Crottes et al., 2016 Wang et al., 2013
Sein	Orai3 CLIC4 Hv1 BKCa TRPM7 SK3/Orai1 P2X7R Orai1/Stim1 SK4 MCU TRPV6 CLIC3 NaV1.5	MCF7 MDA-MB-231 MDA-MB-231 MDA-MB-361 MCF7 MDA-MB-231 - MDA-MB-435s - MDA-MB-435s T47D MDA-MB-231 4T1 (mouse) MDA-MB-231 MDA-MB-231 MDA-MB-231 MCF10DCIS.com MDA-MB-231 MDA-MB-231 MDA-MB-231 - - - - - - pII (MCF7 ER-) -	Boyden modifié Culture 3D Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Métastases Boyden modifié Métastases Boyden modifié Métastases Boyden modifié Boyden modifié Métastases Métastases Boyden modifié Métastases Boyden modifié Culture 3D Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Culture 3D Boyden modifié Boyden modifié Boyden modifié Métastases Métastases Boyden modifié Boyden modifié	Motiani et al., 2013 Chiang et al., 2013 Wang et al., 2011 Khaitan et al., 2009 Du et al., 2014 Middelbeek et al., 2012 Song et al., 2017 Chantome et al., 2013 Gueguinou et al., 2017 Jelassi et al., 2011 Xia et al., 2015 Yang et al., 2009 Thurber et al., 2017 Yu et al., 2017 Jiang et al., 2016 Macpherson et al., 2014 Fraser et al., 2005 Brackenbury et al., 2007 Gillet et al., 2009 Dulong et al., 2014 Brisson et al., 2011 Driffort et al., 2014 Nelson et al., 2015 Mohammed et al., 2016 Fraser et al., 2016

Estomac	TRPV4	MKN45/SGC-7901	Boyden modifié	Xie et al., 2017
	CLIC1	SGC-7901	Métastases	Zheng et al., 2012
	TMEM16A	-	Boyden modifié	Zhao et al., 2015
	Orai1/Stim1	AGS/BGC823	Boyden modifié	Cao et al., 2017
	Nav1.7	BGC803/MNK45	Métastases	Xia et al., 2016
Prostate	TRPV2	PC3	Boyden modifié	Oulidi et al., 2013
	TRPM8	DU145	Boyden modifié	Liu et al., 2016
	TRPV6	PC3	Boyden modifié	Jiang et al., 2016
	Nav1.6 /Nav1.7	PC3	Boyden modifié	Nakajima et al., 2009
	Nav1.4	C4/C4-2	Boyden modifié	Bennett et al., 2004
BKCa	PC3, C4-2	Boyden modifié	Du et al., 2016	
Mélanome	Orai1/Stim1	SK-Mel-2	Métastases	Umemura et al., 2014
		WM793	Activité invadopode	Sun et al., 2014
	CLIC4	A375	Métastases	Chiang et al., 2013
	SK3	518A2	Boyden modifié	Chantome et al., 2009
	NHE1	B16V	Boyden modifié	Vahle et al., 2014
Ovaire	TRPV6	ES-2	Boyden modifié	Jiang et al., 2016
	Nav1.5	Caov-3 / SKOV-3	Boyden modifié	Gao et al., 2010
	TRPM7	SKOV-3	Boyden modifié, 3D	Wang et al., 2014
	CLIC3	A2780	Boyden modifié, 3D	Dozynkiewicz et al., 2012
Cerveau	TRPC6	U373	Boyden modifié	Chigurupati et al., 2010
	Orai1/Stim1	U251	Boyden modifié	Motiani et al., 2013
	Orai1	U251/SNB19	Boyden modifié	Zhu et al., 2014
	SK4	U251	Invasion in situ	Turner et al., 2014
	TRPM7	U87	Boyden modifié	Chen et al., 2015
		N1E-115	Boyden modifié	Wong et al., 2017
			Zymographie	Visser et al., 2013
			Microscopie	
Vessie	TRPM7	T24/5637	Boyden modifié	Gao et al., 2017
	TRPV2	T24/83	Boyden modifié	Oulidi et al., 2013
	SK3	5637	Boyden modifié	Liu et al., 2013
		RT112	Boden modifié	Steinestel et al., 2016
	TRPC3/TRPC6	LD611/RT4	Invasion <i>in vivo</i>	
			Boyden modifié	Kim et al., 2013
Pancréas	TRPM7	BxPC-3	Boyden modifié	Yee et al., 2015
	SK4	MIA PaCa-2	Boyden modifié	Bonito et al., 2016
Foie	Orai1/Stim1	HCC-LM3	Boyden modifié	Yang et al., 2013
	KCNJ11	Huh7 /HepG2	Boyden modifié	Zhang et al., 2018
	MCU	MHCC97H	Boyden modifié	Ren et al., 2017
		SMMC7721	Métastases	
	CLIC5	Huh7	Boyden modifié	Flores-Tellez et al., 2015
	ASIC1 α	SMMC7721	Boyden modifié	Jin et al., 2015
CLIC1	HepG2	Boyden modifié	Wei et al., 2015	
	SMMC7721			
Rein	TRPM7	ACHN/SN12C	Boyden modifié	Ha et al., 2018

4.1. Implication des modulations d'expression et d'activité des canaux ioniques

A. Rôle des canaux potassiques activés par le Ca^{2+} (SK)

Les rôles physiologiques divers des canaux potassiques comprennent notamment le maintien du potentiel de membrane et la transmission du potentiel d'action dans les neurones. Ce canal permet une sortie d'ion K^+ selon le gradient électrochimique (Hille 2001). Par exemple, la surexpression du canal SK4 augmente la dissémination des métastases pulmonaires provenant de cellules cancéreuses mammaires *in vivo* (Thurber et al., 2017). Ce canal est également impliqué dans le potentiel invasif des cellules de gliome *in vitro*. De plus, il est surexprimé dans les cancers du cerveau et son expression inversement corrélée à la survie des patients (Turner et al., 2014). Enfin, SK4 est surexprimé et régule également l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques (Bonito et al., 2016).

Des études décrivent également le rôle d'un autre membre de cette famille, par exemple, le canal SK3. Son expression est détectée seulement dans les cellules cancéreuses de mélanome et les tissus cancéreux de la prostate et du sein. La diminution de son expression par shRNA (short hairpin ribonucleic acid) perturbe la motilité des cellules cancéreuses en culture 3D (Chantome et al., 2009, Chantome et al., 2013). L'utilisation de l'edelfosine, une drogue inhibitrice de ce canal, diminue fortement l'invasion *in vivo* et *in vitro* des cellules cancéreuses de vessie (Steinestel et al., 2016). Son rôle et son expression ont également été étudiés dans le cancer colorectal (Gueguinou et al., 2016).

Le canal potassique BKCa, activé par le Ca^{2+} et le voltage, est surexprimé dans les métastases cérébrales provenant de cancer de sein comparées aux cellules ayant envahi d'autres parties du corps ou aux cellules ayant un faible pouvoir métastatique. L'inhibition de son expression par siRNA (small interfering ribonucleic acid) ou par un inhibiteur chimique, l'ibériotoxine (IBTX), diminue l'invasion de cellules cancéreuses mammaires. De plus, sa surexpression est corrélée au potentiel invasif (Khaitan et al., 2009). Ce canal est également surexprimé dans les tissus cancéreux comparés aux tissus sains de la prostate et l'inhibition de son expression diminue l'invasion *in vivo* et *in vitro* (Du et al., 2016).

B. Rôle des canaux TRP (Transient Receptor Potential)

La famille des canaux TRP regroupe plusieurs groupes de canaux transmembranaires impliqués dans la transduction du message sensoriel. Ils réagissent par exemple aux variations de température, au toucher, à la douleur, à l'osmolarité, aux phéromones et au

goût et à bien d'autres stimuli, tant à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule. Leur ouverture permet une entrée de cations (majoritairement du Ca^{2+} mais ils peuvent être perméable à d'autres cations) (Clapham 2003).

La famille des TRPC, activés par récepteurs couplés aux protéines G et aux tyrosines kinases, est impliquée dans l'invasion. La diminution de l'expression de TRPC5 entraîne une diminution de l'invasion des cellules de cancer colorectal et la surexpression détectée dans les cellules cancéreuses entraîne l'effet inverse. Ces modifications de l'expression du canal endogène induisent une modification d'expression de HIF α et du facteur de transcription sensible au Ca^{2+} Twist qui active l'EMT (Chen et al., 2017). L'inhibition de l'expression de TRPC6 dans l'adénocarcinome pulmonaire diminue l'invasion *in vitro* et la concentration calcique cytosolique induisant une diminution de l'expression de la fibronectine et de ZO-1 (Yang et al., 2017). Ces deux protéines sont associées à l'invasion cellulaire (Jia et al., 2010, Smalley et al., 2005).

L'implication de deux membres de la famille des canaux TRPV a également été démontrée notamment par l'utilisation de molécules chimiques. L'adrénomédulline est un petit peptide isolé à partir de cellules de phéochromocytome humain. Il augmente l'invasion des cellules de carcinomes de la vessie et de la prostate en surexprimant TRPV2 à la membrane augmentant la concentration en Ca^{2+} cytosolique (Oulidi et al., 2013). L'augmentation de son expression stimule l'invasion des cellules cancéreuses de vessie (sans effet sur la prolifération) grâce à l'expression de la MMP-2 (Liu et al., 2013). L'expression homologue de TRPV2 dans des cellules cancéreuses prostatiques augmente l'expression de MMP-9 et de la cathépsine B. A l'opposé, la diminution de l'expression de TRPV2 diminue l'expression de ces protéases (Monet et al., 2010). L'utilisation d'un anesthésique local, la lidocaïne, diminue l'expression de TRPV6, la concentration calcique cytosolique et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires, prostatiques et ovariennes (Jiang et al., 2016).

TRPM7, un membre de la famille des TRPM, est surexprimé dans les tissus cancéreux en lien avec des facteurs de mauvais pronostic (Gautier, et al., 2016). Son inhibition dans les cellules cancéreuses mammaires entraîne une réduction du nombre de métastase *in vivo* (sans effet sur la prolifération) dont la localisation est limitée au poumon (Middelbeek et al., 2012). Dans le même modèle, l'invasion *in vitro* est inhibée par le TG100-115, un nouvel inhibiteur de la kinase couplée à TRPM7, suggérant un rôle de cette enzyme dans ce mécanisme (Song

et al., 2017). Ce canal régule également l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques et de vessie (Gao et al., 2017, Yee et al., 2015).

C. Rôle des canaux SOC (Store Operated Channel)

Les canaux transmembranaires Orai et les protéines réticulaires STIM (stromal interaction molecule) sont les acteurs principaux du courant SOC (Store Operated Ca^{2+} entry). Ce courant entrant de Ca^{2+} est stimulé par la déplétion calcique des stocks réticulaires (Soboloff et al., 2006). Dans les cellules cancéreuses mammaires métastatiques, l'inhibition de l'expression de Orai1 et de STIM1 diminue la capacité métastatique *in vitro* et *in vivo* (Yang et al., 2009). Ces deux protéines ont un rôle dans l'invasion du glioblastome sans affecter la prolifération. Ces résultats ne sont pas retrouvés dans les astrocytes normaux (Motiani et al., 2013). L'inhibition de l'expression de ces protéines diminue également l'invasion des cellules cancéreuses de foie (Yang et al., 2013). Dans les cellules cancéreuses gastriques *in vitro*, ce couple de protéines joue un rôle dans l'expression du marqueur métastatique MACC-1 et de marqueurs d'EMT (vimentine, E-cadhérine). *In vivo*, la diminution de l'expression par shRNA du couple Orai1 et STIM1 perturbe la formation de métastases chez la souris (Xia et al., 2016).

Le canal Orai1 est surexprimé dans les gliomes, comparé aux tissus sains. Le courant SOC généré ce canal permet la phosphorylation de la tyrosine kinase 2 riche en proline qui affecte l'invasion cellulaire et les marqueurs d'EMT (Zhu et al., 2014). Dans les cellules cancéreuses colorectales, l'invasion est diminuée par l'application du 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate), un agent pharmacologique inhibiteur du courant SOC. Comparée aux cellules saines, l'amplitude du courant est plus importante et les réserves calciques réticulaires permettant son activation sont diminuées dans les cellules cancéreuses. Ce remodelage du signal calcique est dû à une perte d'expression de STIM2 et une surexpression du canal TRPC1. Ce canal est capable de s'associer à Orai1 et d'induire un courant SOC plus important (Sobradillo et al., 2014).

D. Rôle des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav)

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de l'entrée de Na^+ dans la cellule qui va permettre une dépolarisation membranaire et la genèse du potentiel d'action neuronal. Leur expression physiologique est restreinte au système nerveux central et périphérique, dans les muscles squelettiques et cardiaques. Les canaux Nav sont classés en

deux groupes selon leur sensibilité à un inhibiteur spécifique, la tétrodotoxine (TTX) (de Lera Ruiz et al., 2015). L'application de la TTX diminue l'invasion cellulaire sans affecter la prolifération des cellules ovariennes cancéreuses. L'expression de Nav1.5 est corrélée à l'agressivité de ce cancer (Gao et al., 2010). La diminution de son expression par siRNA dans des cellules cancéreuses colorectales diminue l'invasion et entraîne de nombreuses modifications d'expression de gènes qui pourraient potentiellement être impliqués dans le phénotype invasif (House et al., 2010). Dans le cancer du sein invasif, un variant particulier néonatal du canal sodique nNav1.5 est surexprimé et régule l'invasion et la formation des métastases ganglionnaires (Brackenbury et al., 2007, Fraser et al., 2005). Le rôle de ce canal dans l'invasion est confirmé par des études utilisant des traitements chimiques : la ranolazine, un anti arythmique, ainsi qu'un dérivé naturel de la propolis, le CAPE (caffaic acid phenethyl ester) bloquent le courant généré par Nav1.5 et diminuent l'invasion des cellules MDA-MB-231 *in vitro* et *in vivo* sans effet additif de la tétrodotoxine un inhibiteur spécifique des courants Nav (Driffort et al., 2014, Fraser et al., 2016)

L'expression du canal Nav1.4 est corrélée au potentiel invasif des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques. La surexpression transitoire de ce canal augmente la capacité invasive *in vitro* (Bennett et al., 2004). Le traitement de la lignée cellulaire cancéreuse prostatique (PC-3) avec un acide gras polyinsaturé ω -3, l'EPA (acide écosapentaénoïque), diminue l'invasion des cellules en inhibant l'expression de Nav1.6 et Nav1.7 (Nakajima et al., 2009).

E. Rôle d'autres canaux cationiques et des canaux chlorures

Le récepteur canal P2X7R possède une perméabilité aux cations divalents dépendante de la fixation de l'ATP. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (KN62 et A740003) diminue fortement l'invasion ATP-induite des cellules cancéreuses pulmonaires (Jelassi et al., 2011). Le canal potassique voltage dépendant Kv11.1 (hERG1) est surexprimé et régule l'invasion des cellules cancéreuses colorectales (Lastraioli et al., 2004). Un autre canal voltage dépendant perméable au Ca^{2+} , CaV1.3, et plus particulièrement sa sous unité α 1D régule l'invasion et est surexprimé dans les tissus colorectaux cancéreux comparés aux tissus sains (Fourbon et al., 2017).

Le canal TMEM16A, permettant un efflux de chlore (Cl^-) de la cellule, est activé par le Ca^{2+} . L'extinction stable de son expression diminue l'invasion des cellules cancéreuses

pulmonaires (Jia et al., 2015). La surexpression d'un autre canal perméable au chlore, CLIC4, (chloride intracellular channel 4) permet aux cellules cancéreuses de sein et de mélanome de contrer la diminution d'invasion entraînée par un traitement par photothérapie dynamique (Chiang et al., 2013).

Une corrélation inverse entre le canal CLIC1 et la sous unité β de l'activateur du protéasome (PA28 β) est établit dans les tissus et les lignées cellulaires cancéreuses gastriques. Lorsque CLIC1 est invalidé, PA28 β est surexprimé et l'invasion est diminuée (Zheng et al., 2012). Une étude transcriptomique montre que l'inhibition de CLIC1 diminue l'expression de 618 gènes dont plusieurs MMPs (2,9, 11 et 12) (Wei et al., 2015).

4.2. Rôle du microenvironnement tumoral via les canaux ioniques

Les études visant à comprendre le cancer portaient initialement sur les altérations de mécanismes intracellulaires permettant à la cellule normale de se transformer pour devenir cancéreuse. Les études actuelles s'intéressent aux mécanismes qui impliquent le microenvironnement tumoral. Par exemple, l'échappement au système immunitaire ou l'inflammation font partie d'une nouvelle génération de mécanismes influençant la progression tumorale. Le microenvironnement pourrait expliquer les résultats différents entre les modèles cellulaires et animaux. Par exemple, la surexpression du canal KCa3.1 augmente la dissémination des métastases pulmonaires issues de cellules cancéreuses mammaires *in vivo* mais est sans effet *in vitro* (Thurber et al., 2017).

Dans l'ACP, le stroma représente 80 % du volume tumoral (Farrow et al., 2008). Il contient une matrice extracellulaire dense issue d'une réaction desmoplasique élevée et des cellules particulières associées à la tumeur telles que des cellules stellaires, des fibroblastes et des cellules immunitaires. Ces cellules expriment de nombreuses molécules qui vont participer à la modulation de la réponse immunitaire ou à l'invasion cellulaire (Beatty et al., 2015, Rosati et al., 2015). La faible vascularisation due à cette matrice dense entraîne une déplétion en nutriment et en oxygène qui exercent une pression de sélection et rend les cellules moins accessibles aux drogues anticancéreuses (Neesse et al., 2013). En clinique, cet environnement dense entraîne des erreurs dans l'évaluation de l'efficacité du traitement (Katz et al., 2012). L'interaction entre le stroma et les canaux ioniques est bidirectionnelle. L'expression et l'activité des canaux ioniques, influencés par les caractéristiques du

microenvironnement, module l'invasion cellulaire. Les canaux ioniques peuvent également moduler les caractéristiques du stroma (**Figure 24**).

A. Implication des cellules immunitaires associées à la tumeur

La co-culture de cellules cancéreuses colorectales avec des macrophages associés à la tumeur augmente l'invasion des cellules cancéreuses et l'expression du canal potassique KCa3.1 dans les macrophages. L'augmentation de l'expression du canal est stimulée par la sécrétion du TNF α régulée par PRL-3 dans les cellules cancéreuses. Les macrophages vont ensuite sécréter de manière KCa3.1-dépendante les interleukines 6 et 8 qui vont augmenter l'invasion des cellules cancéreuses (Xu et al., 2014).

B. Implication du microenvironnement hypoxique

Le milieu extracellulaire hypoxique entraîne la production par les cellules d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – reactive oxygen species) qui vont augmenter l'invasion cellulaire. Cette production de ROS peut être médiée par des canaux présents à la membrane des organites intracellulaires tel que le canal MCU (mitochondrial Ca²⁺ uniporter) dans le carcinome hépatique ou le canal transmembranaire CLIC 1 (Wei et al., 2015). TRPC6 est surexprimé dans le glioblastome et de manière plus importante dans un contexte hypoxique. Cette surexpression augmente le Ca²⁺ cytosolique, entraîne une activation de la calcineurine et de NFAT impliquée l'invasion cellulaire (Chigurupati et al., 2010).

C. Implication du microenvironnement acide

Les tumeurs se développent souvent dans un microenvironnement acide. En effet, les cellules cancéreuses ont un métabolisme hautement glycolytique différent des cellules normales qui produit des métabolites acides en grande quantité. Pour éviter une diminution trop importante du pH cytosolique, un efflux d'ions H⁺ s'effectue, acidifiant le milieu extracellulaire et augmentant l'agressivité cellulaire (DeCoursey 1991, Giannelli et al., 2002). Cette acidification extracellulaire perturbe l'expression de canaux dont l'ouverture est sensible au pH. Les cellules de cancer colorectal cultivées dans un milieu acide présentent une augmentation de l'expression d'ASIC2 comparées à des cellules en conditions de culture normales. ASIC2 entraîne une augmentation du Ca²⁺ cytosolique *via* la voie calcineurine/NFAT induisant une surexpression de CXCR1 (récepteur A de l'interleukine 8) qui joue un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse (Liu et al., 2016). L'implication d'ASIC2 est confirmée *in vivo* dans la formation de métastases

hépatiques (Zhou et al., 2017). Un autre canal de la même famille, ASIC1 α , est impliqué dans l'invasion *in vitro* de cellules cancéreuses hépatiques cultivées dans un milieu acide. Son expression est également augmentée dans ces cellules et dans les tissus tumoraux métastatiques en corrélation avec le grade du cancer (Jin et al., 2015).

D'autres canaux vont participer à l'acidification extracellulaire. Le canal Hv1 participe à l'invasion cellulaire *via* un efflux d'ions H⁺ et une sécrétion de la MMP-2. Son expression est corrélée à l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires et coliques (Sennoune et al., 2004, Wang et al., 2011, Wang et al., 2013). Le canal voltage dépendant Nav1.7 est surexprimé dans des lignées cellulaires et des tissus de cancers gastriques en corrélation avec le pronostic. L'inhibition de Nav1.7 diminue l'expression de NHE1 *via* un mécanisme impliquant MACC-1 (Xia et al., 2016). NHE1 joue un rôle important dans l'efflux d'ions H⁺ et dans la dissémination métastatique des cellules cancéreuses de mélanome *in vitro* et *in vivo* (Vahle et al., 2014). Le blocage d'un autre membre de la famille des Nav, nNav1.5, rend le microenvironnement basique entraînant une modification de l'activité des cystéines B et S ayant une activité optimale à pH acide (Gillet et al., 2009).

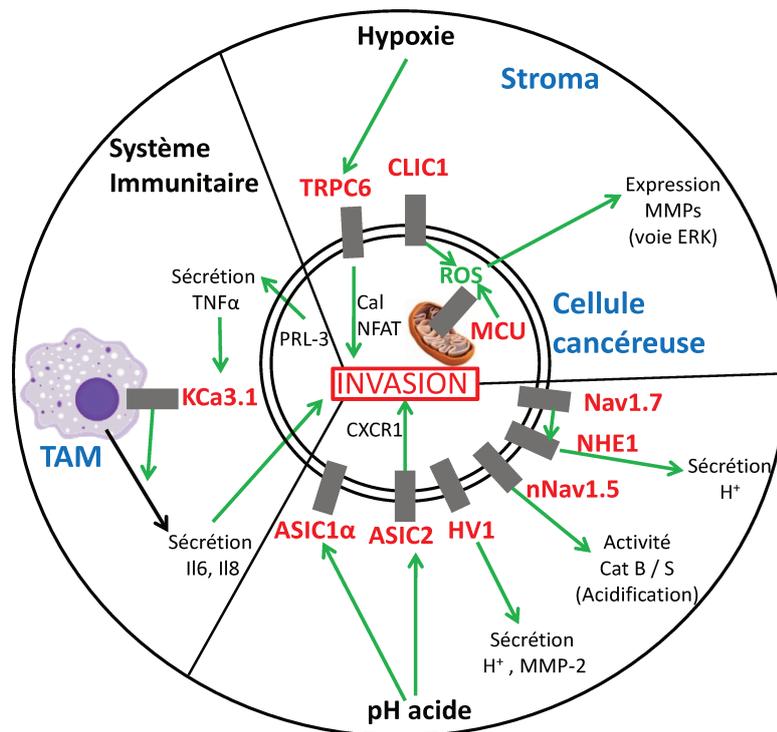


Figure 25 : Rôle du stroma tumoral et des canaux dans l'invasion cellulaire

MMPs : métalloprotéases matricielles, cat : cathépsine, Il : interleukine, TNF α : tumor necrosis factor α , NFAT : Nuclear factor of activated T-cells, TAM : tumor associated macrophages, cal : calcineurine, PRL-3 : phosphatase of regenerating liver-3, ROS : reactive oxygen species, MCU : mitochondrial Ca²⁺ uniporter

4.3. Description des signalisations impliquant les canaux ioniques

A. Etude des interactions entre les partenaires protéiques et les canaux ioniques

D'autres études moléculaires mettent en évidence des interactions entre les canaux et des protéines dont le rôle est décrit dans l'invasion cellulaire. Dans les cellules agressives mammaires MDA-MB-231 ou les cellules MCF-10A normales modifiées pour devenir agressives, le canal CLIC3 et la MMP-14 sont colocalisés dans les endosomes tardifs. Cette interaction permet à la MMP-14 de transloquer vers les sites d'adhésion à la MEC et permettre la digestion de celle-ci ainsi et l'invasion cellulaire *in vitro* (Macpherson et al., 2014). Ce canal, dans le cancer de l'ovaire, est colocalisé avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et permet son recyclage à la membrane plasmique. Ce mécanisme régulant l'invasion cellulaire est dépendant de l'expression de Rab25 (Dozynkiewicz et al., 2012). CLIC5, un canal de la même famille, interagit *in vitro* avec l'eitrine et PODXL et l'expression de ces trois acteurs est retrouvée dans les biopsies d'hépatocarcinome (Flores-Tellez et al., 2015).

Les canaux potassiques sont également impliqués dans des interactions qui vont réguler l'agressivité des cellules cancéreuses. Un complexe membranaire entre hERG, l'intégrine $\beta 1$ et la protéine chaperonne Sig1R est détecté dans les cellules de cancers colorectaux. L'inhibition de Sig1R déstabilise ce complexe et réduit l'invasion *in vivo* (Crottes et al., 2016). Dans les cellules cancéreuses mammaires, le canal BKCa et la cavéoline-1 sont co-localisés dans des nanodomains lipidiques membranaires. L'invalidation de l'expression de la cavéoline-1 par siRNA entraîne une activation et une surexpression de BKCa et augmente la prolifération et l'invasion cellulaire. Ces résultats démontrent le rôle inhibiteur sur l'invasion cellulaire de la cavéoline-1 en interagissant avec BKCa (Du et al., 2014).

Dans l'adénocarcinome hépatique, une interaction activatrice de l'invasion est décrite entre le canal potassique sensible à l'ATP, KCNJ11 et la lactate déshydrogénase A (Zhang et al., 2018). Les canaux potassiques peuvent interagir avec des protéines du cytosquelette et des enzymes mais également avec d'autres canaux. Dans les cellules cancéreuses de sein, les canaux Orai1 et SK3 sont colocalisés dans les radeaux lipidiques et permettent une augmentation de Ca^{2+} cytosolique indépendante de STIM1. L'utilisation de l'Ohmlin délocalise SK3 hors de ces domaines, diminue la concentration calcique cytosolique et la capacité des cellules cancéreuses à former des métastases *in vivo* sans affecter la croissance de la tumeur primaire (Chantome et al., 2013). Dans les cellules cancéreuses colorectales, l'utilisation de l'Ohmlin dissocie le complexe entre SK3, Orai1 et TRCP1 dépendant de la

phosphorylation de la protéine STIM1 (Gueguinou et al., 2016). Dans ces deux modèles, SK3 interagit directement avec la chaperonne SigmaR1 dont la présence est nécessaire pour la localisation du complexe SK3/Orai1 dans les radeaux lipidiques. De plus, l'expression de cette chaperonne est corrélée au grade du cancer et inversement corrélée à la survie des patients (Gueguinou et al., 2017). Le canal TRPV4 est impliqué dans l'agressivité tumorale *via* des interactions protéiques. Il interagit avec CaSR (récepteur sensible au Ca^{2+}) et augmente la taille de la tumeur et la capacité métastatique *in vivo* des cellules cancéreuses gastriques en impliquant une voie dépendante de la β -caténine et Akt (Xie et al., 2017).

B. Description des voies de signalisation régulant l'invasion via les canaux ioniques

Dans la littérature, des voies de signalisation sont décrites de manière récurrente dans la régulation de l'invasion impliquant les canaux ioniques. Ces différentes voies (MAP kinases et PI3kinase/Akt notamment) sont activées par l'oncogène Ras qui est la cible de mutation gain de fonction dans l'ACP (Jonckheere et al., 2017). La voie des MAP kinases, aboutissant à la phosphorylation des protéines ERK, est décrite dans plusieurs modèles. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques démontre que le canal Nav1.7 régule l'invasion des cellules cancéreuses pulmonaires *via* cette voie (Campbell et al., 2013). Cette même voie conduisant à la phosphorylation de protéines et de facteurs de transcription (ici FAK et NFAT) régule l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MCF7 *in vitro* par un mécanisme nécessitant la présence du canal Orai3 (Motiani et al., 2013). Dans le mélanome, Stim1 et Orai1 sont impliqués dans la formation de métastases pulmonaires *in vivo via* la voie des MAPkinases (Umemura et al., 2014). Dans les cellules cancéreuses mammaires pII (MCF7 n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes), l'inhibition de Nav1.5 entraîne également une diminution de l'invasion *in vivo en* diminuant l'activité des MMPs en modifiant la voie impliquant ERK et de l'EGF (Mohammed et al., 2016). L'expression du canal TRPM8 est augmentée dans des cellules cancéreuses prostatiques DU145 comparées aux cellules non tumorales. L'inhibition de l'activité de ce canal par le BCTC (3-trifluorométhylpyridin-2-yl-piperazine-1-carboxylic acid) montre une diminution de la phosphorylation d'ERK (Liu et al., 2016). Dans les cellules cancéreuses colorectales, l'inhibition de CLIC1 par un inhibiteur pharmacologique spécifique (IAA94) va diminuer la phosphorylation d'ERK entraînant une diminution d'expression de la MMP-2 (Wang et al., 2014). Ce mécanisme a également été observé dans les cellules cancéreuses gastriques (Zhao et al., 2015).

L'utilisation du carvacol bloque le courant TRPM7 dans les cellules de gliome. Cet inhibiteur va diminuer l'expression de la MMP-2 en diminuant l'activation de la voie des MAP kinases mais également la voie PI3K/Akt, une deuxième voie activée dans le cancer couramment décrite (Chen et al., 2015). Cette même voie est activée par ce canal dans le carcinome ovarien (Wang et al., 2014). Dans le cancer du sein, le récepteur P2X7R régule l'invasion de cellules T47D en affectant la voie impliquant Akt conduisant à des variations d'expressions de la cadhérine et de MMP-13 (Xia et al., 2015). Dans les cellules cancéreuses colorectales, l'EGF et l'activation de la voie Akt permettent la phosphorylation de STIM1, permettant la formation du complexe entre SK3/Orai1/TRPC1, régulant l'invasion cellulaire (Gueguinou et al., 2016).

D'autres études montrent une implication des canaux et de la protéine Src impliquée dans la formation de l'invadopode, structure indispensable pour la cellule invasive. Src activée va pouvoir ensuite jouer un rôle dans plusieurs voies de signalisation. Dans le mélanome, le Ca^{2+} *via* Orai1 facilite l'assemblage de l'invadopode en modifiant l'activation de la protéine Src. De plus, Orai1 favorise le recyclage de la MMP-14 à la membrane plasmique pour induire la dégradation de la matrice extracellulaire (Sun et al., 2014). La surexpression du variant néonatal nNav1.5 dans les cellules cancéreuses mammaires est dépendante de RhoA (Brisson et al., 2011, Dulong et al., 2014). La régulation de l'invasion par nNav1.5 pourrait mettre en jeu une voie impliquant Src, le CD44 et la cortactine (Nelson et al., 2015).

4.4. Régulations transcriptionnelles des canaux ioniques

Physiologiquement, les canaux peuvent être exprimés largement dans l'organisme ou de manière plus restreinte à des organes précis. Dans le cancer, ils peuvent être exprimés dans des organes où ils n'étaient pas présents physiologiquement ou voire leur expression augmentée de manière aberrante par rapport aux tissus sains. La surexpression des canaux ioniques dans le cancer est due notamment à des échecs de système de répression d'expression de gènes. Par exemple, dans des conditions normales, le microRNA-340 empêche la surexpression de MCU, ce qui ralentit la glycolyse qui est la réaction majoritaire fournissant de l'énergie aux cellules cancéreuses. Cette inhibition d'expression entraîne ainsi une diminution de l'invasion *in vitro* et *in vivo*. Ce mécanisme ne serait pas fonctionnel dans les cellules mammaires humaines (Yu et al., 2017). Un autre microRNA suppresseur de tumeur, le 381, inhibe la signalisation TGF β et l'EMT. Il est diminué dans les tissus et les

lignées cellulaires de cancer gastrique et sa sous expression est reliée à l'agressivité du cancer. Le canal TMEM16A, une cible de ce microRNA, est surexprimé dans ce cancer (Cao et al., 2017). Dans les cellules de cancer de la vessie, la protéine macroH2A1 va recruter les histones déacetylases 1 et 2 permettant une acétylation des histones autour des loci des canaux TRPC6 et TRPC3 inhibant leur expression. La diminution de l'expression de macroH2A1 entraîne donc une surexpression des deux TRPC (Kim et al., 2013).

PARTIE 3 : LE CANAL TRPM7

Chez l'Homme, la famille TRP comprend 28 membres divisés en 6 groupes en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés : TRPC (canonical), TRPM (mélastatine), TRPV (vanilloïde), TRPA (ankyrine), TRPML (mucolipine) et TRPP (polycystine) (**Figure 26**). Les membres de cette famille ont suscité un intérêt initialement par rapport à leur fonction en tant que capteurs de stimulus externes (environnementaux ou chimiques). Cette famille a ensuite été étudiée pour son rôle dans la régulation de l'homéostasie ionique et plus particulièrement du Ca^{2+} . Ces canaux permettent un influx de cations qui va dépolariser la membrane et entraîner de nombreuses réponses intracellulaires. Les modifications de l'homéostasie calcique participe à la régulation du cancer et plus particulièrement l'invasion (Shapovalov et al., 2016).

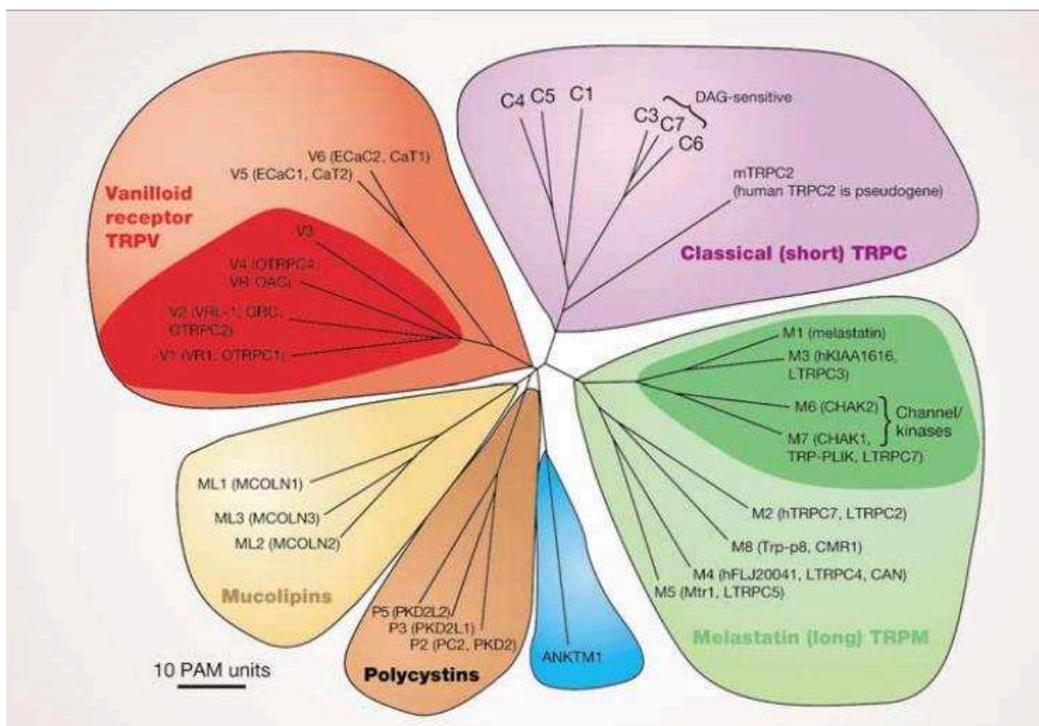


Figure 26 : Classification phylogénétique des canaux TRP
(Clapham 2003).

L'assemblage de 4 sous-unité α transmembranaires en homo- ou hétérotétramère forme un canal TRP. La sous-unité α possède une structure commune à tous les TRP : 6 segments transmembranaires (s1-s6) avec un pore formé par les segments s5 et s6 et les extrémités amine et carboxylique sont cytosoliques (Clapham 2003). Physiologiquement, ils ont une

expression ubiquitaire. Un canal de cette famille, le canal TRPM7 est surexprimé dans les biopsies de tissus tumoraux comparées aux tissus sains adjacents ou à des tissus provenant d'individus ne souffrant pas de pathologies pancréatiques. Cette expression est en corrélation avec l'extension de la tumeur reflétée par le grade histologique. Les grades 2 et 3 présentent une expression plus forte de TRPM7 ; la différence d'expression entre ces deux grades n'est pas établie à cause de la faible disponibilité des échantillons de grade 3. Cette surexpression est inversement corrélée à la survie (Rybarczyk et al., 2012, Yee et al., 2011).

1. DECOUVERTE ET STRUCTURE

TRPM7 a été décrit pour la première fois par deux équipes. L'étude de Runnels en 2001 a décrit le canal TRP-PLIK appartenant à la famille des LTRPC (long transient receptor potential channels) comme un partenaire interagissant avec le domaine carboxylique de la phospholipase C β (PLC β). Cette interaction s'effectue *via* une kinase possédant des similitudes avec les domaines catalytiques de deux α -kinases : celle de la chaîne lourde de la myosine de type B et celle du facteur d'élongation 2 (MHCK B et eEF-2 kinase). Ce canal cationique permet de dépolariser la cellule et d'augmenter dans les cellules non-excitables la concentration en Ca^{2+} cytosolique (Runnels et al., 2001). La même année, l'étude de Nadler décrit le canal LTRPC7 possédant une structure et des propriétés électrophysiologiques similaires à TRP-PLIK. Cette équipe corrobore sa large expression, démontre son rôle critique dans la viabilité et la croissance dans un modèle de lymphocytes DT-40 (Nadler et al., 2001).

Le gène de TRPM7 humain est localisé dans la région 21 du bras long du chromosome 15 et contient 40 exons. L'ARNm a une longueur d'environ 7 kb et son expression est retrouvée dans divers organes, de façon plus importante dans le cœur, le foie, les reins et la rate (Fonfria et al., 2006, Runnels et al., 2001). Sa localisation dans les tissus et les modèles cellulaires peut être cytoplasmique et membranaire (Runnels et al., 2001, Yee et al., 2015). Cette protéine codant pour un canal transmembranaire de 1863 acides aminés (correspondant à 210 KDa) peut s'associer en homotétramères ou en hétérotétramères avec son homologue TRPM6 (Chubanov et al., 2007). En plus de la structure commune à tous les TRP, son domaine amine contient 4 domaines mélastatine dont la fonction est inconnue et une région hydrophobe H1. Son domaine carboxylique contient le domaine TRP, la région coiled-coil (CC) permettant l'assemblage et l'adressage de la protéine (Fujiwara et al., 2008).

L'extrémité du domaine carboxylique est fusionnée à une kinase ce qui lui permet d'appartenir aux groupes des canaux (Montell et al., 1989, Riazanova et al., 2001) (Figure 27).

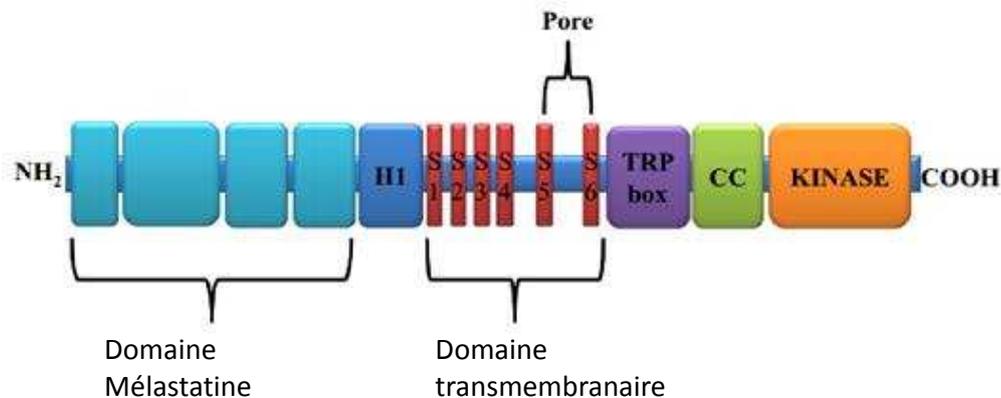


Figure 27: Structure du canal TRPM7

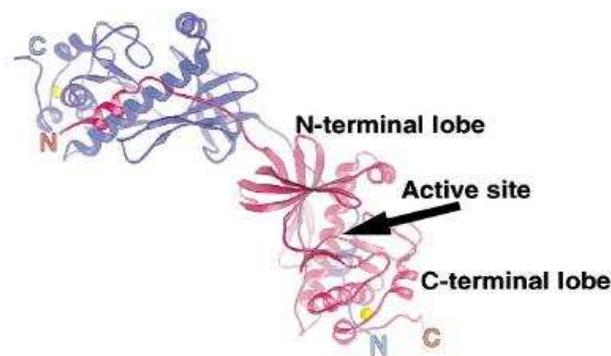
De l'extrémité amine vers carboxylique : TRPM7 contient 4 domaines mélastatine conservés chez les membres de la famille TRPM, une région hydrophobe H1, 6 segments transmembranaires (s1-s6) avec un pore formé par les segments s5 et s6, le domaine TRP, la région coiled-coil (CC) nécessaire à l'assemblage et l'adressage de la protéine et un domaine sérine/thréonine kinase. Les extrémités amine et carboxylique sont cytosoliques (Gautier et al., 2016).

1.1. *Activité canalaire*

Le patch-clamp, développé par Neher et Sackmann (1981), est une technique d'électrophysiologie cellulaire. Elle consiste à aspirer avec une pointe en verre une petite partie de la membrane cellulaire, appelée patch, afin d'étudier les propriétés des canaux ioniques. Comme les ions portent une charge électrique, leurs mouvements génèrent un courant électrique mesurable. Cette densité de courant est rapportée à la capacité membranaire qui permet de normaliser la quantité de courant par rapport à la taille de la cellule. Plusieurs configurations sont possibles : la configuration cellule entière (whole-cell) mesure l'activité électrique de l'ensemble des canaux transmembranaires alors que d'autres configurations permettent de mesurer des courants microscopiques à l'échelle du canal et de pouvoir modifier le milieu intracellulaire (configuration inside-out) ou de ne pas perturber le milieu intracellulaire (configuration cell-attached). L'application d'un potentiel électrique sur la membrane allant de -100 à +100 mV permet de mesurer les courants ioniques qui se développent à travers la membrane plasmique (voltage-clamp). TRPM7 permet l'entrée de cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) pour des potentiels de membrane imposés négatifs. Cette

surtout au niveau de l'extrémité amine contenant la boucle d'activation. Néanmoins, elles possèdent des similitudes au niveau du site catalytique, notamment le domaine riche en glycine retrouvé dans la plupart des protéines liant l'ATP et également des motifs en doigt de Zn^{2+} riches en cystéines au niveau de l'extrémité carboxylique du lobe (Runnels et al., 2001, Yamaguchi et al., 2001). Elles utilisent exclusivement l'ATP comme substrat. Cette spécificité serait due à la présence d'un résidu glutamate très conservé en position 1718. La kinase de TRPM7 présente des singularités vis-à-vis des autres membres de sa famille de par son assemblage en tétramère fonctionnel constitué de deux fois deux dimères (dont un dimère est schématisé sur la **figure 29**) et les résidus qu'elle phosphoryle. En effet, il s'agit d'une sérine/thréonine kinase contrairement aux autres membres qui phosphorylent seulement la thréonine (Crawley et al., 2009, Ryazanova et al., 2004, Yamaguchi et al., 2001).

Figure 29 : Structure du domaine kinase



Les monomères sont représentés en rouge et en bleu. Les atomes de zinc (indiqués par les cercles jaunes) sont importants pour la stabilité du domaine kinase. Les extrémités amine et carboxylique sont indiquées en tant que N et C (Yamaguchi et al., 2001).

Ces sérines et thréonines peuvent se trouver dans différents substrats *in vitro*. Le premier substrat découvert est la PLC δ 2 (phospholipase C gamma 2) dans les lymphocytes B. Cette enzyme est phosphorylée au niveau de plusieurs résidus (ser 1164 du domaine C2, thr 1045 de la région linker entre le domaine catalytique et C2) (Deason-Towne et al., 2012, Runnels et al., 2001, Runnels et al., 2002). La kinase peut phosphoryler la MBP (myelin basic protein) qui est un acteur important dans la formation de la gaine de myéline des neurones, ce qui suggère un rôle potentiel dans le développement du cerveau (Ryazanova et al., 2004). Une majorité des substrats de la kinase de TRPM7 sont des protéines du cytosquelette. La phosphorylation de la tropomoduline 1 interfère avec sa capacité d'interaction et son affinité envers les filaments d'actine (Dorovkov et al., 2008, Ryazanova et al., 2004). La chaîne lourde de la myosine IIA, régulant la motilité et l'adhésion dans les cellules non-

musculaires, est également un substrat de la kinase de TRPM7. Dans les cellules surexprimant TRPM7, le traitement par la bradykinine provoque une entrée de Ca^{2+} cytosolique et permettrait une autophosphorylation du canal ainsi qu'un changement de conformation au niveau de l'extrémité carboxylique (localisée dans les podosomes et les points d'adhésion focaux). Cette localisation permettrait une fixation entre TRPM7 et le complexe d'actomyosine. Cette proximité permettrait à la kinase de phosphoryler la myosine (thr 1800, ser 1803, ser 1808 du domaine CC) provoquant une stabilisation du complexe (Clark et al., 2006, Clark et al., 2008). TRPM7 est capable de phosphoryler également la myosine IIB et IIC mais de manière non-spécifique car son homologue TRPM6 en est également capable (Clark et al., 2008).

Un autre substrat est l'annexine A1 (ser 5 du domaine amine) impliquée dans la croissance, la différenciation et l'apoptose. Sa phosphorylation empêche sa conformation en hélice α et son interaction avec la membrane plasmique directe ou indirecte *via* un dimère de protéines S100A11 (Dorovkov et al., 2004).

La kinase de TRPM7, en phosphorylant la kinase d'eEF2 (eucaryotic elongation factor), aurait également un rôle dans la modulation de la synthèse protéique en réponse au taux de Mg^{2+} . eEF2 permet la translocation des protéines dans les ribosomes. Dans ce modèle, en présence d'une faible concentration magnésique extracellulaire, la kinase de TRPM7 phosphoryle la kinase d'eEF2 (ser 77) qui est activée. La kinase activée va phosphoryler le facteur eEF2 conduisant à son inhibition empêchant la translocation des protéines sur les ribosomes (Perraud et al., 2011).

La kinase serait capable de moduler l'expression des gènes également en phosphorylant l'histone H3 (Ryazanova et al., 2004). Clivable en conditions pro-apoptotiques, la kinase fixe de façon Zn^{2+} dépendante des protéines capables de remodeler la chromatine (Desai et al., 2012, Krapivinsky et al., 2014).

Le canal TRPM7 est capable également d'autophosphorylation (Ryazanova et al., 2004). Le domaine carboxylique comprend de nombreux sites de phosphorylation (plus d'une quarantaine sur le domaine isolé) dont ceux présents sur la protéine entière sont illustrés sur la **figure 30**. Il est démontré que l'autophosphorylation du canal permet un meilleur accès au substrat pour la kinase et une activité optimale (Clark et al., 2008, Kim et al., 2012).

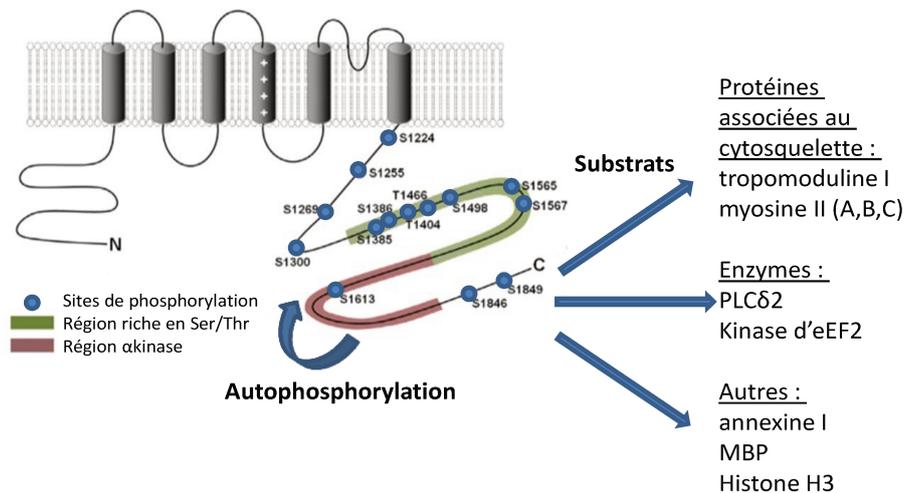


Figure 30 : Sites d'autophosphorylation de TRPM7 et substrat de la kinase
(Modifié d'après Kim, et al. 2012).

2. REGULATIONS

Dès sa découverte, plusieurs régulations de l'activité canalaire de TRPM7 ont été étudiées notamment *via* les ions et plus particulièrement le Mg^{2+} libre ou couplé aux nucléotides. La régulation du domaine kinase est moins décrite dans la littérature.

2.1. Régulations physiologiques de l'activité canalaire

A. Par les ions libres

Lors de la découverte de TRPM7, la première régulation négative mise en évidence a été par le Mg^{2+} cytosolique libre ce qui a donné le nom de courant MIC (Mg^{2+} inhibited cation) au courant généré par le canal (Nadler et al., 2001, Runnels et al., 2001). Cette inhibition du courant a été confirmée dans différents modèles avec une concentration inhibitrice 50 (CI50) de l'ordre de 660-700 μM proche de la concentration physiologique de Mg^{2+} libre dans le cytoplasme (Demeuse et al., 2006, Kozak et al., 2002, Nadler et al., 2001, Schmitz et al., 2003). Pour observer la fonctionnalité du canal avec la technique du patch-clamp, on doit donc dialyser le milieu intracellulaire avec de l'EGTA (Ethylene-bis(oxyethylenitrilo) tetraacetic acid) qui va chélater le Mg^{2+} (Demeuse et al., 2006). L'observation d'un profil diphasique de la courbe dose réponse dans les lymphocytes JurKat et les cellules HEK-293T montre qu'il existe 2 sites de fixations pour le Mg^{2+} cytosolique, un de forte affinité (CI50 environ 25 μM) et de faible affinité (CI50 environ 91 μM) (Chokshi et al., 2012). D'autres ions divalents cytosoliques (Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) sont capables de bloquer le courant avec une

Cl₅₀ plus élevée (quelques mM) comparée à celle du Mg²⁺ (Kozak et al., 2003). Le courant TRPM7 est également inhibé par l'hypertonie intracellulaire due à l'accumulation de Mg²⁺ et des halides (principalement des anions monovalents : le chlore (Cl⁻), le bromure (Br⁻) et l'iode (I⁻)) (Bessac et al., 2007, Yu et al., 2013).

Les cations divalents extracellulaires (les cations métalliques et surtout le Mg²⁺ de façon dose dépendante de l'ordre du mM) potentialisent l'entrée des cations divalents mais inhibent la perméabilité du canal aux cations monovalents (Monteilh-Zoller et al., 2003, Nadler et al., 2001).

B. Par les ions couplés aux nucléotides

Le canal est également sensible aux ions couplés aux nucléotides (ATP, TTP, CTP, GTP, UTP, ITP dans l'ordre décroissant d'efficacité) ce qui donne au courant qu'il génère l'acronyme MagNuM (Mg²⁺ nucleotide regulated metal ion current) (Kozak et al., 2002, Nadler et al., 2001). Le Mg²⁺ libre cytosolique est capable d'inhiber le courant de façon beaucoup plus importante quand il est couplé aux nucléotides. En effet, la Cl₅₀ du Mg²⁺ est environ 5 fois plus faible en présence de Mg-ATP (Penner et al., 2007). Cette régulation synergique entre ces deux acteurs permettrait d'obtenir environ 90 % d'inhibition dans les conditions physiologiques. Elle serait due à deux sites de fixation distincts sur le canalyse : le Mg²⁺ se fixe au niveau de la partie canal sur le site M alors que le Mg-ATP au niveau de la kinase dans le site N (Demeuse et al., 2006).

C. Par le pH

Au niveau extracellulaire à un pH physiologique (7,4), les cations divalents vont bloquer la circulation des ions monovalents alors que lorsque le pH diminue de 7,4 à 4, la sensibilité du canal pour les divalents diminue due à une compétition entre les ions H⁺ et les ions divalents. Cette compétition conduit à une levée du blocage du courant entrant (Jiang et al., 2005). Cette régulation positive par les ions H⁺ dépend notamment de la présence de deux résidus glutamate en position 1047 1052, au niveau du pore du canal, qui joueraient le rôle de senseur du pH extracellulaire (Li et al., 2007).

Le pH cytosolique influence également le courant MIC. En effet, l'accumulation des ions H⁺, en interagissant avec le site de faible affinité pour le Mg²⁺ cytosolique, inhiberait le courant (Chokshi et al., 2012, Kozak et al., 2005).

D. Autres régulations

Le stress oxydant, générant des ROS telles que l'eau oxygénée (H_2O_2) ($CI_{50}=16\mu M$), inhibe le canal de façon irréversible en l'oxydant en le rendant plus sensible au Mg^{2+} cytosolique. La sensibilité est également dépendante de l'état métabolique de la cellule et notamment la quantité d'ATP. En effet, si la quantité d'ATP cytosolique diminue alors la sensibilité aux ROS augmente (Inoue et al., 2014). L'utilisation du CCCP, un ionophore perturbant la fonction mitochondriale, va modifier la courant généré par TRPM7 (Kim et al., 2007). TRPM7 est également sensible aux forces mécaniques lui permettant de participer à la différenciation ostéogénique (Liu et al., 2015).

E. Régulations controversées

a. Par les récepteurs couplés aux protéines G

La régulation de TRPM7 *via* les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) n'est pas complètement élucidée à ce jour. TRPM7 possède plusieurs sites de fixation du PIP2. L'activité canalaire de TRPM7 requiert du PIP2 mais son rôle précis est encore débattu (Visser et al., 2014). Une première étude montrait que le PIP2 active directement le canal TRPM7 alors que sa consommation par la PLC activée par une protéine Gq va inhiber le canal préactivé par une faible concentration en Mg^{2+} extracellulaire (Runnels et al., 2002). De façon contradictoire, la bradykinine, un agoniste de la voie PLC, augmente l'activité kinase et canalaire de TRPM7 (Clark et al., 2006, Langeslag et al., 2007). Une autre étude montre que l'activité du canal TRPM7 implique d'autres protéines G. L'activité est inhibée par la stimulation de récepteurs muscariniques couplés aux protéines G_i et activée par la stimulation de récepteurs adrénergiques couplés aux protéines G_s (Takezawa et al., 2004).

b. Par la kinase

Dès la découverte du canal TRPM7, il a été suggéré que la kinase avait un rôle dans l'activité canal mais toutes les régulations la faisant intervenir sont loin d'être connues. La kinase en fixant le Mg-ATP potentialise l'inhibition exercée par ces ions couplés aux nucléotides. Elle est également capable d'interagir avec le domaine C2 de la $PLC\beta$ ou δ , ce qui suggère une implication dans la régulation exercée par la PLC (Riazanova et al., 2001).

La kinase par voie d'autophosphorylation pourrait réguler le canal mais cette régulation est controversée. Suite à des mutations sur le domaine kinase, l'intensité des courants

enregistrés est diminuée (Runnels et al., 2001). Cependant, ces résultats n'ont pas été validés par la vérification de la présence des canaux à la membrane. Les résultats obtenus pourraient s'expliquer par une diminution de l'expression ou un mauvais adressage des protéines mutées à la membrane. Des protéines mutantes pour des sites d'autophosphorylation présente une diminution de la phosphorylation avec une modification de la sensibilité du courant au Mg^{2+} libre ou couplé aux nucléotides (Hermosura et al., 2002, Schmitz et al., 2003). Le retrait de la totalité du domaine kinase conduit à l'expression de canaux non-fonctionnels malgré un taux d'expression semblable à la forme sauvage de la protéine. D'après ces observations, le domaine kinase ne semble pas réguler les courants *via* sa fonction catalytique mais sa présence, permettant un assemblage et un adressage correct, serait nécessaire à l'expression de canaux fonctionnels (Matsushita et al., 2005).

D'autres études utilisant d'autres mutants pour les sites d'autophosphorylation ou pour l'activité catalytique montrent que l'activité kinase ne serait pas nécessaire à la fonction canal (Matsushita et al., 2005, Schmitz et al., 2003). La kinase est capable de moduler d'autres types de courant, par exemple, les courants SOC dans les lymphocytes B DT-40 (Faouzi et al., 2017).

TRPM7 et son homologue TRPM6, appartenant toutes les deux au groupe des chanzymes, peuvent former des hétérotétramères fonctionnels, ce qui suggère des possibilités de régulation entre ces deux protéines (Yamaguchi et al., 2001). En effet, il a été décrit que TRPM7, phosphorylée par TRPM6 au sein de l'hétérotétramère TRPM6/7 (et non dans l'homotétramère TRPM7), peut perdre en sensibilité vis-à-vis du Mg-ATP. TRPM7 n'est pas capable de phosphoryler TRPM6 (Schmitz et al., 2003, Zhang et al., 2014).

2.2. Régulations physiologiques de l'activité kinase

Cette enzyme, comme la plupart des kinases, est régulée par le Mg^{2+} (concentration optimale située entre 4-10 mM) qui est un cofacteur nécessaire à son activation (Ryazanova, et al. 2004). L'activité enzymatique est modulée par d'autres cations métalliques diffusibles à travers le canal : le Zn^{2+} et le Co^{2+} l'inhibent alors que le Mn^{2+} la stimule et le Ca^{2+} n'a pas d'effet jusqu'à 1 mM (Matsushita et al., 2005, Ryazanova et al., 2004). La kinase pourrait jouer un rôle de senseur ionique en régulant son activité en fonction de la quantité de Mg^{2+} libre cytosolique (Deason-Towne et al., 2012, Krapivinsky et al., 2014, Perraud et al., 2011).

Toutes ces régulations mettent en jeu des ions auxquels TRPM7 est perméable, ce qui suggère que l'activité canalaire de TRPM7 pourrait réguler l'activité de sa kinase (Visser et al., 2014). De plus, les 14 sites de phosphorylations cytoplasmiques pourraient être des modulateurs de l'activité kinase (Kim et al., 2012).

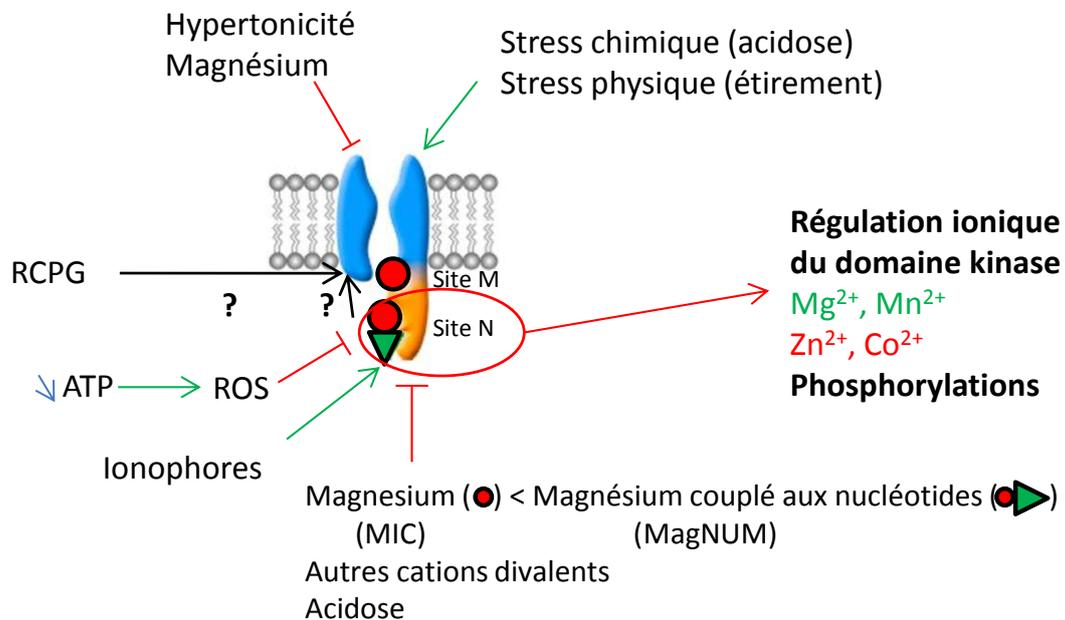


Figure 31 : Régulation physiologique du domaine canalaire et kinase de TRPM7.
(d'après Demeuse et al., 2006).

3. MODULATION PHARMACOLOGIQUE

Il est nécessaire de disposer de molécules pour moduler l'expression ou l'activité du canal afin de déterminer les mécanismes physiopathologiques dans lesquels il est impliqué. La plupart des agents pharmacologiques manquent de spécificité. Le **tableau 8** récapitule les molécules connues pour moduler l'activité de TRPM7 (Chubanov et al., 2017, Gautier et al., 2016).

Tableau 8 : Régulation pharmacologique de TRPM7
(Modifié d'après (Chubanov et al., 2017, Gautier et al., 2016).

Nom	Doses utilisées (μM)(CI50=*)	Modèle cellulaire	Mécanismes touchés	Autres canaux que TRPM7
Inhibiteurs				
carvacrol	561*	U87	Prolifération Migration Invasion (Chen et al., 2015)	TRPL, TRPV3, TRPA1 (Parnas et al., 2009)
Ginsenoside Rd	131* 134 *	AGS MCF-7	Prolifération (Kim et al., 2013)	ASIC (Zhang et al., 2012)
NS8593	1, 10 et 30	MDA-MB-231	TEM (Davis et al., 2014)	SK (Haugaard et al., 2015)
2-APB	100 50	Lymphocyte T Jurkat C6	Acidification du milieu intracellulaire (Chokshi et al., 2012) Prolifération (Leng et al., 2017)	TRP
Waixenicin A	3,2 * 0,84* 30 et 50*	T Jurkat- RBL1 NIA-115 AGS et MCF-7	Prolifération (Zierler et al., 2011) Invasion (Visser et al., 2013) Prolifération (Kim et al., 2013)	SK (Chubanov et al., 2012)
Xyloketal B	287*	U251	Prolifération Migration (Chen et al., 2015)	VDCC SOC (Zhao et al., 2018)
Resveratrol	50	DU145 PC3	EMT Migration (Sun et al., 2018)	VGSC (Fraser et al., 2014)
Kushen (Sophorae Radix)	150 μ g/mL	AGS MCF-7	Prolifération Survie (Kim 2012)	
Nafamosat	617 27	HEK-293T Neurone (culture I)	(Chen et al., 2010)	
Sphingosine	0.6*	HEK 293	(Qin et al., 2013)	TRPM6
FTY720	0.7*	HEK 293	Prolifération Migration (Qin et al., 2013)	SK1
Activateurs				
Naltriben (Type 1)	50 20,7*	U87 HEK 293	Invasion Migration (Wong et al., 2017)	
Mibefradil (Type 2)	53	HEK 293	(Schafer et al., 2016)	

Type 1 : indépendant de la $[Mg^{2+}]_i$ / Type 2 : actif à faible $[Mg^{2+}]_i$

Culture I : culture primaire

Les inhibiteurs de la famille des α -kinases se fixent majoritairement dans la poche de fixation de l'ATP et ne sont pas spécifiques de la kinase de TRPM7. Le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques ouvre un champ de recherche encore peu étudié. Récemment, un potentiel inhibiteur de cette kinase a été découvert, le TG100-115 (CI₅₀=2 μ M). Néanmoins, à des doses plus importantes, il va inhiber l'invasion, la phosphorylation de la myosine IIA et de FAK mais aussi l'activité canalaire de TRPM7, ce qui suggère que les réponses cellulaires engendrées par cet inhibiteur ne seraient pas dues exclusivement à l'inhibition de la kinase de TRPM7 (Song et al., 2017).

4. ROLE EN PHYSIOLOGIE

Au niveau de l'organisme, TRPM7 a une expression ubiquitaire mais plus élevée dans des organes où il va jouer un rôle physiologique tels que dans le cerveau, l'hypophyse, le cœur, les os et le tissu adipeux (Fonfria et al., 2006). Sa surexpression dans les cellules HEK-293 entraîne une altération de l'expression de 951 gènes (Lee et al., 2011). De plus, les nombreuses régulations auxquelles TRPM7 est soumis suggèrent qu'il jouerait un rôle d'intégrateur des signaux à la fois extracellulaires et intracellulaires permettant d'adapter les fonctions cellulaires à l'environnement *via* des flux ioniques rapides ou *via* son activité kinase.

TRPM7 est perméable à plusieurs ions mais il est principalement impliqué dans l'entrée du Mg^{2+} et également celle du Ca^{2+} . L'homéostasie du Ca^{2+} est très bien décrite et implique de nombreux transporteurs calciques et protéines tampons qui vont réguler sa concentration cytoplasmique et dans les différents organites intracellulaires. Cet ion est un second messenger universel intervenant dans de nombreuses voies de signalisation conduisant à la régulation de nombreuses fonctions telles que la contraction, la mortalité cellulaire ou encore le développement embryonnaire (Berridge et al., 2003). Contrairement au Ca^{2+} , l'homéostasie du Mg^{2+} est peu décrite. Pourtant, le Mg^{2+} est le deuxième ion le plus abondant dans la cellule après le K^+ et c'est le plus important cofacteur enzymatique. Ainsi, il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques (Romani 2011).

4.1. Développement embryonnaire / différenciation

TRPM7 possède un rôle déterminant dans le développement embryonnaire. En effet, *in vivo*, les souris invalidées pour TRPM7 meurent avant le 7^{ème} jour de développement (Jin et al., 2008). Les mêmes observations sont réalisées sur des souris dans lesquelles est exprimée la forme mutée de TRPM7 (sans le domaine kinase). Ces modifications entraînent une forte perturbation de l'homéostasie magnésique (Ryazanova et al., 2010). L'étude de l'embryogénèse chez le Xénope a permis de montrer que TRPM7 est impliqué plus précisément dans l'étape de la gastrulation. Dans cette étude, le rôle est indépendant du domaine kinase et l'importance du Mg^{2+} est confirmée. Ces malformations peuvent être évitées par la surexpression du transporteur au Mg^{2+} SLC42A dans les cellules TRPM7 KO (knock-out) (Liu et al., 2011).

Les KO conditionnels permettent de prouver l'implication de TRPM7 à des temps précis dans le développement et la fonctionnalité de certains organes. TRPM7 est requis pour la fonction cardiaque normale en régulant l'activité pacemaker *in vitro* et *in vivo* (Jin et al., 2012, Sah et al., 2013).

Concernant le système nerveux, TRPM7 va affecter la formation de la crête neurale et la différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules souches neurales (Jin, et al. 2012). Dans le cerveau de souris après la naissance, le domaine kinase est impliqué dans la formation des synapses et leur plasticité influençant la mémoire (Liu et al., 2018). TRPM7 joue un rôle dans les communications synaptiques des neurones sensoriels conduisant à la réponse aux stimuli chez le poisson zèbre (Low et al., 2011). Dans ce même modèle animal, TRPM7 est impliqué dans le développement du pancréas (Yee et al., 2011). Concernant le développement d'une autre glande annexe du système gastro-intestinal, le foie, le courant TRPM7 est plus faible dans les lignées embryonnaires comparées à des hépatocytes de rat différenciés. Cette augmentation du courant s'explique non pas par une modification d'expression de TRPM7 mais une répartition entre la membrane plasmique et le noyau différente selon l'état de différenciation (Ogunrinde et al., 2017).

TRPM7 est impliqué à différents niveaux du métabolisme osseux. L'inhibition de TRPM7 supprime l'influx calcique induit par RANK-L qui permet la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes (Yang et al., 2013). Un autre modèle s'intéresse à la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses où TRPM7 est impliqué *via* la voie

Notch1 et le Mg^{2+} (Diaz-Tocados et al., 2017). Une étude appuie ces résultats et montre que le Mg^{2+} entrant par TRPM7 est impliqué dans les mécanismes d'homéostasie osseuse (Zhang et al., 2017). L'homéostasie du cartilage implique TRPM7 en jouant sur la maturation des chondrocytes *via* sa perméabilité au Ca^{2+} et au Mg^{2+} et la voie PI3K/Akt (Lu et al., 2017). TRPM7 permet l'activation des lymphocytes d'un état quiescent à activé *via* une entrée de Mg^{2+} (Sahni et al., 2008, Sahni et al., 2010). Dans les macrophages, TRPM7 régule la polarisation entre le phénotype anti- et pro-inflammatoire (Schilling et al., 2014). Il est également impliqué dans le développement d'autres organes tels que le thymus ou encore le tissu adipeux (Chen et al., 2014, Jin et al., 2008).

4.2. Mort / Survie cellulaire

Dans les cellules stellaires hépatiques, la diminution de l'expression de TRPM7 entraîne une augmentation de la voie TRAIL pro-apoptotique et du stress réticulaire dans les cellules attestant d'un rôle protecteur (Liu et al., 2012, Zhu et al., 2014). L'entrée de Mg^{2+} *via* ce canal permet l'élimination des produits de synthèse toxiques de la mélanine, protégeant les mélanocytes de la nécrose (McNeill et al., 2007). Lors de l'hypoxie cérébrale, TRPM7 aurait un rôle protecteur des neurones contre le stress oxydatif (Aarts et al., 2003).

A l'inverse, d'autres études montrent un rôle pro-apoptotique de TRPM7 par différentes approches. Dans les neurones PC-12, le knockdown de TRPM7 va protéger les neurones de la mortalité induite par le LPS (lipopolysaccharide) (Nunez-Villena et al., 2011). Dans les cellules fibroblastiques, l'inhibition de TRPM7 par siRNA augmente la résistance aux agents pro-apoptotiques (doxorubicine, cycloheximide, staurosporine) en entraînant une diminution du Mg^{2+} cytosolique, du stress oxydant, de l'activation de la p38 MAPK et de la JNK ainsi que de la caspase 3 et de PARP (Chen et al., 2012). Le domaine kinase, séparé du canal par la caspase 8 ayant clivé le résidu D1510, va activer la voie pro-apoptotique impliquant Fas dans les lymphocytes T (Desai et al., 2012). Le rôle pro-apoptotique de la kinase en interagissant avec un complexe annexine 1-myosine IIA a également été démontré dans les neurones (Zhao et al., 2015). TRPM7 est également impliqué dans d'autres types de mort cellulaire telles que la nécroptose ou l'autophagie dépendantes du Ca^{2+} dans les cellules HEK-293 (Cai et al., 2014, Oh et al., 2015).

4.3. Prolifération

Les cellules en culture qui n'expriment plus TRPM7 ne prolifèrent plus, ce qui montre son rôle important dans la croissance cellulaire (Runnels et al., 2001, Schmitz et al., 2003). Une supplémentation en Mg^{2+} permet la prolifération des cellules TRPM7^{-/-} indiquant le rôle prépondérant de cet ion (Schmitz, et al. 2003). Dans les ostéoblastes, la diminution de la concentration extracellulaire en Mg^{2+} et Ca^{2+} diminue la prolifération et augmente l'expression de TRPM7 pour maintenir une homéostasie ionique intracellulaire correcte. L'inhibition de l'expression de TRPM7 par siRNA va prévenir l'influx de ces ions dans la cellule (Abed et al., 2007). Lors du développement du pancréas chez le poisson zèbre, la prolifération est diminuée suite à des mutations de TRPM7. Cet effet est restauré par un ajout de Mg^{2+} et implique Socs3a (Yee et al., 2011). Le blocage pharmacologique de TRPM7 va diminuer la prolifération dépendante du Mg^{2+} dans les lymphocytes T (Zierler et al., 2011). Une autre approche par inhibition stable de TRPM7 donne des résultats similaires sur la prolifération et l'effet du Mg^{2+} est confirmé. En effet, la prolifération est restaurée de façon complète par l'ajout de Mg^{2+} extracellulaire ou incomplète *via* l'expression d'un canal avec une kinase inactive qui présente une sensibilité différente au Mg^{2+} (Sahni et al., 2008). Le Mg^{2+} joue un rôle également dans l'angiogenèse résultant de la prolifération des cellules endothéliales en affectant la progression dans le cycle cellulaire. L'inhibition de TRPM7 mime les effets d'une déficience en Mg^{2+} et limite cette prolifération (Baldoli et al., 2012). La compensation de la diminution de la prolifération suite au déficit de TRPM7 peut se faire par l'expression de transporteurs de Mg^{2+} : SLC41A1 (Mandt et al., 2011), SLC41A2 (Sahni et al., 2007) et MagT1 (Deason-Towne et al., 2011).

Dans d'autres études, l'ajout de Mg^{2+} ne permet pas de revenir à une prolifération normale, comme par exemple dans les astrocytes n'exprimant plus TRPM7 (Zeng et al., 2015). Dans les macrophages, l'activité canalaire de TRPM7, plus importante dans les cellules anti inflammatoires M2, est impliquée dans la prolifération induite par IL4 (Schilling et al., 2014). Dans les cellules HUVEC, l'inhibition de TRPM7 diminue le courant entrant de cations et la prolifération *via* la voie ERK et la production d'oxyde nitrique (Inoue et al., 2009). Une coopération des courants calciques ICRAC et générés par TRPM7 permet de réguler la progression des mastocytes dans le cycle cellulaire (Tani et al., 2007). TRPM7 influence également le développement du système cardiovasculaire. En effet, il régule la prolifération

liée à l'hyperglycémie dans les cellules musculaires lisses vasculaires en interaction avec les ROS et la voie ERK (Yang et al., 2017). La prolifération des adipocytes et la différenciation des fibroblastes cardiaques induites par l'angiotensine II impliquent TRPM7 (Chen et al., 2014, Li et al., 2017). La kinase de TRPM7 serait impliquée dans la prolifération des lymphocytes de souris avec un mécanisme incluant le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et les courants SOC (Beesetty et al., 2018).

4.4. Adhésion cellulaire

La surexpression de TRPM7 dans les cellules HEK-293 entraîne un décollement cellulaire suivi d'une importante mortalité cellulaire (Nadler et al., 2001). Ce décollement n'est pas dû à une cytotoxicité mais à l'activation de la m-calpaïne impliquée dans le détachement. En effet, ce changement d'adhésion serait dû à une entrée de cations par TRPM7 qui serait recruté au niveau des complexes d'adhésion focaux à la suite d'un signal encore inconnu. Cette entrée entrainerait une augmentation localisée de Mg^{2+} et surtout du Ca^{2+} cytosolique qui active la m-calpaïne (Su et al., 2006). Dans une autre étude, il n'est pas décrit la nécessité des cations dans l'activation de la m-calpaïne. L'activation implique les ROS et l'oxyde nitrique produits suite à un stress oxydatif dans des cellules surexprimant TRPM7. Ces molécules seraient responsables en partie de l'activation de la m-calpaïne et de l'activation de la p38 MAPK et de la JNK qui entraînent une perte d'adhésion (Su et al., 2010). La bradykinine stimulant TRPM7 entraîne une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} et l'autophosphorylation de son domaine kinase. Ensuite, la kinase de TRPM7 interagit avec les filaments de myosine IIA. Leur phosphorylation conduit à une stabilisation du cytosquelette et la mise en place de podosomes (Clark et al., 2006). Dans les cellules vasculaires endothéliales, l'inhibition de TRPM7 va diminuer l'adhésion cellulaire entraînant une diminution de la migration nécessaire à la formation des vaisseaux sanguins par une voie impliquant ERK et la chaîne légère de la myosine (Zeng et al., 2015).

4.5. Migration cellulaire

La désorganisation du cytosquelette permet dans un premier temps une perte d'adhésion puis la migration cellulaire. Cette désorganisation peut se faire en réponse à des pressions extracellulaires appliquées à la membrane qui activent TRPM7. Le canal active ensuite des protéines impliquées dans la migration dans des zones où le Ca^{2+} est présent en grande

quantité (Clark et al., 1987). Une autre étude corrobore ce rôle de par la localisation spécifique de TRPM7 au niveau de l'uropode des lymphocytes T migratoires (Kuras et al., 2012). De plus, son inhibition entraîne un défaut d'activation des protéines migratoires rac et cdc42 qui est restaurée par sa surexpression ou par une entrée de Mg^{2+} suite à l'expression hétérologue de SLC41A2 dans les fibroblastes (Su et al., 2011). La modulation pharmacologique de TRPM7 par la bradykinine et le 2-APB démontre son rôle dans la migration dans deux modèles cellulaires : les astrocytes et les cellules musculaires vasculaires (Yogi et al., 2009, Zeng et al., 2015).

5. ROLE EN PATHOLOGIE

La description des rôles de TRPM7 en pathologie s'est concentrée notamment sur les fonctions cérébrale et cardiaque (Paravicini et al., 2012, Visser et al., 2014). Par exemple, l'induction chimique de la maladie de Parkinson, par exposition à la 6 hydroxydopamine, serait prévenue grâce à la surexpression du microRNA 22 neuroprotecteur. Ce microRNA agirait en diminuant l'expression de TRPM7 (Yang et al., 2016). Ce canal est impliqué également dans l'hypoxie et l'ischémie neuronale qui sont des causes de neurodégénérescence impliquée dans les démences d'origines vasculaires qui représentent 30% des maladies neurodégénératives (Aquino et al., 2013). Une étude montre que l'anoxie dans les neurones de l'hippocampe induit un influx magnésique *via* TRPM7 (Zhang et al., 2011). Un autre microRNA, le 135a, protègerait *in vivo* de la fibrose cardiaque où TRPM7, le collagène de type I, et l' α SMA sont surexprimés (Wu et al., 2018).

Des mutations du canal ont été identifiées comme participant à certaines pathologies qui sont qualifiées du terme canalopathies comme par exemple la sclérose latérale ou la maladie de parkinson de type G (Hermosura, et al. 2005). TRPM7 muté est impliqué également dans le développement d'un macrothrombocytopenie chez l'homme et la souris (Stritt et al., 2016).

Au niveau cellulaire, TRPM7 est impliqué dans processus physiologiques (développement, différenciation, prolifération, migration, adhésion) qui vont permettent la formation et le fonctionnement normal des organes. Ces mêmes mécanismes peuvent être dérégulés lors de pathologies comme le cancer. Nous nous y intéressons plus particulièrement car TRPM7 est surexprimé dans plusieurs cancers en corrélation avec des paramètres cliniques (**Tableau**

9). Ces cancers sont considérés comme des oncocanalopathies car l'implication du canal est exploré au-delà des modèles *in vitro* sur des tissus du patients ou *in vivo* (Prevarskaya et al., 2018). L'apport des connaissances sur son implication dans les mécanismes permettant le développement du cancer depuis sa découverte en 2001 est croissant. Au niveau des mécanismes, la fonction canalaire par la modification de l'homéostasie du Ca^{2+} et du Mg^{2+} ainsi que la fonction kinase peuvent être impliqués de manière dissociée ou associée. De plus, le ratio entre ces deux cations intra- ou extracellulaire peut être impliqué dans les mécanismes de cancérogénèse (Trapani et al., 2013).

Tableau 9 : Corrélation de la surexpression de TRPM7 dans les tissus cancéreux avec les paramètres cliniques
(Gautier, et al. 2016).

Cancer	Corrélation entre la surexpression et les paramètres cliniques <i>Corrélation inverse</i>
Sein	Grade Potentiel mitotique Apparition des métastases et de microcalcifications Envahissement des ganglions lymphatiques <i>Survie</i>
Nasopharynx	Grade Apparition des métastases <i>Survie</i>
Ovaire	<i>Survie</i>
Pancréas	Grade et la taille de la tumeur primaire Apparition des métastases <i>Survie</i>

5.1. Prolifération

La prolifération des cellules cancéreuses est indispensable au développement de la tumeur primaire et implique TRPM7 par différentes voies de signalisation sans préciser quelle partie du canal est impliquée comme dans les cancers touchant le cerveau (glioblastome et neuroblastome) (Chen et al., 2015, Chen et al., 2015, Leng et al., 2017, Liu et al., 2014). Dans

le carcinome rénal, TRPM7 est un biomarqueur de mauvais pronostic et est impliqué dans la prolifération *in vitro* par la phosphorylation d'Akt et l'activation du facteur de transcription FOXO1 (Zhao et al., 2018). Dans un autre modèle cellulaire de carcinome rénal, l'inhibition de TRPM7 entraîne une modification des protéines en faveur d'un retour vers un phénotype épithélial, augmente la production des ROS et l'apoptose couplé à un arrêt du cycle cellulaire en G0-G1. *In vivo*, l'inhibition de TRPM7 entraîne une croissance plus faible des tumeurs chez des souris immunodéprimées (Cao et al., 2016).

Dans les cellules cancéreuses mammaires exprimant les ER (Estrogen Receptor), TRPM7 *via* un influx calcique va réguler la prolifération (Guilbert et al., 2009). L'inhibition de TRPM7 dans les cellules cancéreuses du pharynx et de la thyroïde diminue également la prolifération dépendante du Ca^{2+} (Jiang et al., 2007). Dans le cancer du pharynx, la régulation de la prolifération par TRPM7 implique la protéine Rb qui participe à la régulation du cycle cellulaire et une activation de la voie de signalisation impliquant STAT3 (signal transducers and activators of Transcription 3) (Dou et al., 2013, Qin et al., 2016). Dans le cancer de la prostate, TRPM7 permet un influx calcique en réponse à une augmentation du ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ extracellulaire qui permet la prolifération des cellules cancéreuses *via* la voie ERK/Akt (Sun et al., 2013, Sun et al., 2014). Dans le rétinoblastome, TRPM7 régule la prolifération cellulaire par sa perméabilité au Ca^{2+} et impacte le passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire (Hanano et al., 2004).

TRPM7 peut réguler les mécanismes de cancérogénèse *via* la régulation de l'homéostasie magnésique. Dans les adénocarcinomes gastriques, l'inhibition de TRPM7 par siRNA montre une diminution de la survie cellulaire et de la prolifération qui est restaurée par une supplémentation en Mg^{2+} (Kim et al., 2008). Ce résultat est retrouvé dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique (Yee et al., 2011). TRPM7 est impliqué dans la prolifération dépendante du Mg^{2+} dans les cellules cancéreuses de colon (Huang et al., 2017). La différence de sensibilité à la doxorubicine des cellules de cancer colorectal est due à une modification des expressions des canaux magnésiques TRPM7 et MagT1 impactant leur prolifération et les mécanismes de détoxification (Cazzaniga et al., 2017).

5.2. Migration / Invasion

Le rôle de TRPM7 ne se limite pas à la prolifération et va jouer en plus sur les mécanismes de migration et d'invasion cancéreuses (Cao et al., 2016, Gao et al., 2017, Luo et al., 2016, Sun

et al., 2014, Wong et al., 2017). *Via* l'entrée de Ca^{2+} par un courant CICR (calcium-induced calcium release) couplant TRPM7 et les récepteurs à la ryanodine du réticulum endoplasmique, il régule la migration des cellules cancéreuses du nasopharynx (Chen et al., 2010). L'expression de TRPM7, stimulée par le cholestérol dans les cellules cancéreuses prostatiques, promeut la migration des cellules *via* une diminution du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation de l'activité de la m-calpaïne (Sun et al., 2014). Plus récemment, la même équipe a montré une induction de l'EMT TRPM7 dépendante sur un modèle de cellules cancéreuses prostatiques stimulées par le TGF β . De plus, dans ce modèle, la migration est stimulée par l'ajout de Mg^{2+} mais pas de Ca^{2+} (Sun et al., 2018).

Le tableau 8 résume les cancers dans lesquels TRPM7 est impliqué plus précisément dans l'invasion cellulaire. TRPM7, dans les cellules de neuroblastome murin, est impliqué dans la formation des invadopodes par un mécanisme indépendant de la formation de micro-domaines riches en Ca^{2+} ou de la concentration calcique cytosolique (Visser et al., 2013). La kinase de TRPM7 *via* la phosphorylation de la myosine IIA participe à ce mécanisme (Clark et al., 2008). Ces différents rôles dans l'invasion pourraient faire intervenir TRPM7 par sa capacité à participer à la régulation de l'homéostasie magnésique qui est décrite comme dérégulée dans le cancer. Dans le glioblastome, le Mg^{2+} est retrouvé sous sa forme lié en plus grande quantité entraînant une diminution du Mg^{2+} libre. Cette diminution conduisant à une levée de l'inhibition de TRPM7 pourrait jouer un rôle dans l'invasion cellulaire (Chandra et al., 2016). Dans les cellules humaines de carcinome du colon, l'imagerie magnésique mesure un taux de Mg^{2+} libre cytosolique plus faible que la normale en-dessous de 0,3 mM (Castiglioni et al., 2015). *In vivo*, les souris ayant un régime pauvre en Mg^{2+} présentent des tumeurs primaires moins développées mais avec la présence de métastases en plus grandes quantités (Nasulewicz et al., 2004). On ne connaît pas les mécanismes conduisant à la surexpression de TRPM7 (mutations, modification post-traductionnelles) ni son rôle dans l'invasion cellulaire basale dans l'ACP.

PARTIE 4 : PROJET DE THESE

1. IMPLICATION DE TRPM7 DANS LES MECANISMES METASTATIQUES DE L'ACP

Le canal TRPM7 est une protéine transmembranaire ubiquitaire mais exprimée de manière plus importante dans les organes où elle régule des mécanismes cellulaires physiologiques (survie, prolifération, migration et invasion) impliqués dans la fonction et le développement des organes. Il a été décrit que TRPM7 est impliqué dans le processus de développement normal du pancréas et il est surexprimé de manière aberrante dans les tumeurs d'ACP, la forme la plus fréquente du cancer du pancréas (Rybarczyk et al. 2012, Yee et al. 2011).

On peut donc émettre l'hypothèse que TRPM7 pourrait intervenir dans des mécanismes intervenant dans le développement physiologique du pancréas mais qui dans un cadre pathologique du cancer se trouvent dérégulés. Dans les modèles cellulaires cancéreux pancréatiques non métastatiques BxPC-3 Kras sauvage et PANC-1 et Kras muté, le rôle de TRPM7 a été démontré dans la prolifération Mg^{2+} dépendante (Yee et al. 2011). Le blocage de la prolifération serait dû au déclenchement d'une sénescence cellulaire. De plus, les cellules sont plus sensibles à un agent chimiothérapeutique, le gemcitabine, prouvant que TRPM7 est impliqué dans les mécanismes de survie cellulaire (Yee et al., 2012).

Au laboratoire, nous avons démontré que le canal TRPM7 est fonctionnel dans la lignée BxPC-3. La diminution d'expression de TRPM7 induit une baisse de la concentration cytosolique en Mg^{2+} mais sans modification de l'homéostasie calcique. En parallèle, nous avons observé que son inhibition perturbe la migration Mg^{2+} dépendante (Rybarczyk et al., 2012). L'ACP étant très métastatique, nous nous intéressons plus particulièrement à l'invasion qui est un facteur limitant capital pour la progression cancéreuse. Pour étudier l'invasion, nous allons utiliser les modèles cellulaires PANC-1 et Mia PaCa-2 plus indifférenciés correspondant à des cancers de grade 3. La lignée MIA PaCa-2 est la lignée dérivée de cancer pancréatique la plus indifférenciée et possédant une capacité métastatique *in vivo* (Suemizu et al., 2007). Les résultats de Yee en 2015, montrent que TRPM7 est impliqué dans l'invasion de la lignée MIA PaCa-2 stimulée par un gradient de sérum de veau fœtal (Yee et al., 2015).

2. IMPLICATION DE TRPM7 DANS UN AUTRE MODELE DE CELLULES INVASIVES STIMULEES PAR LE CD²⁺

La pollution environnementale est un facteur de risque pour le développement de maladies non-transmissibles. Parmi elles sont retrouvées majoritairement des maladies cardiovasculaires, respiratoires et également le cancer. Cette pathologie est provoquée par des mutations génétiques héréditaires ou déclenchées par des cancérogènes auxquels nous sommes exposés. Les expositions contrôlables sont liées à notre hygiène de vie. 40 % des cancers pourraient être évités en la modifiant par exemple en ne fumant pas, en limitant sa consommation d'alcool et l'exposition au soleil (données OMS, 2017). Concernant le cancer du pancréas, l'arrêt du tabac depuis 1 à 10 ans abaisse le risque de 2,2 à 1,64 et depuis 15 à 20 ans à 1,12 (Wolfgang et al., 2013). Les expositions non contrôlables aux polluants sont plus difficilement étudiables de par leur complexité car nous sommes rarement exposés à un seul polluant au cours de notre vie. De plus, les effets des faibles doses ou des expositions sur des temps longs sont mal connus. Néanmoins, les apports des modèles animaux et les études épidémiologiques donnent des arguments démontant une relation cause-effet probable. Les experts du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) ont conclu en 2013 sur la carcinogénicité de la pollution atmosphérique. Concernant la pollution des sols, la même année, le CIRC conclut à de fortes présomptions entre l'exposition professionnelle à des pesticides et certains types de cancers (INCA, 2018). En France, plus particulièrement dans les régions de Nord, il existe un parallèle entre la pollution des sols et la mortalité par cancer (**Figure 32**).

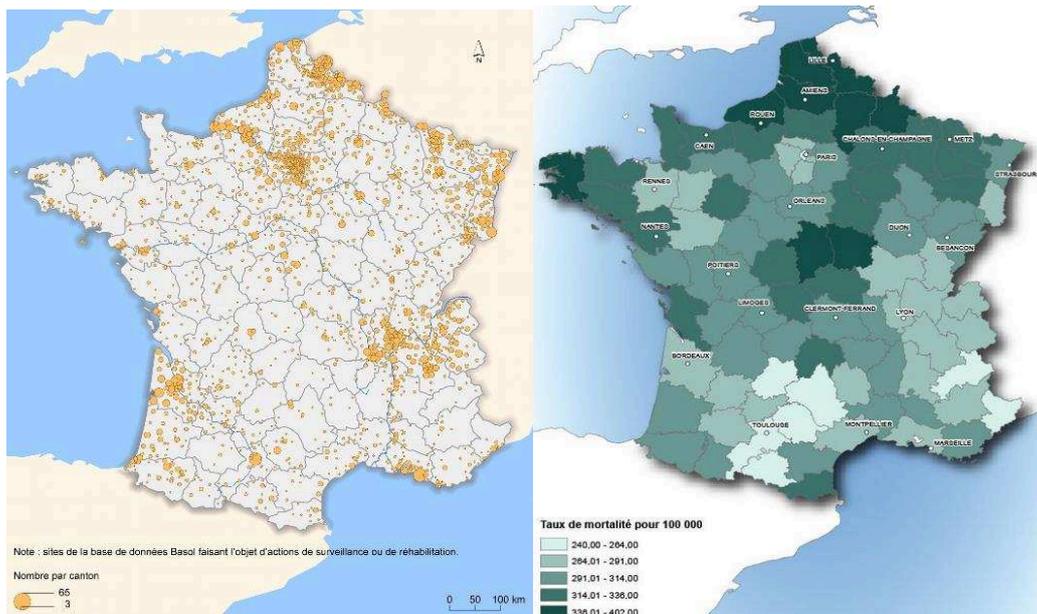


Figure 32 : Parallèle entre la répartition des sites et sols pollués et la mortalité par cancer en France métropolitaine (Modifié d'après BASOL et INSEE, données de 2015 et 2012 respectivement).

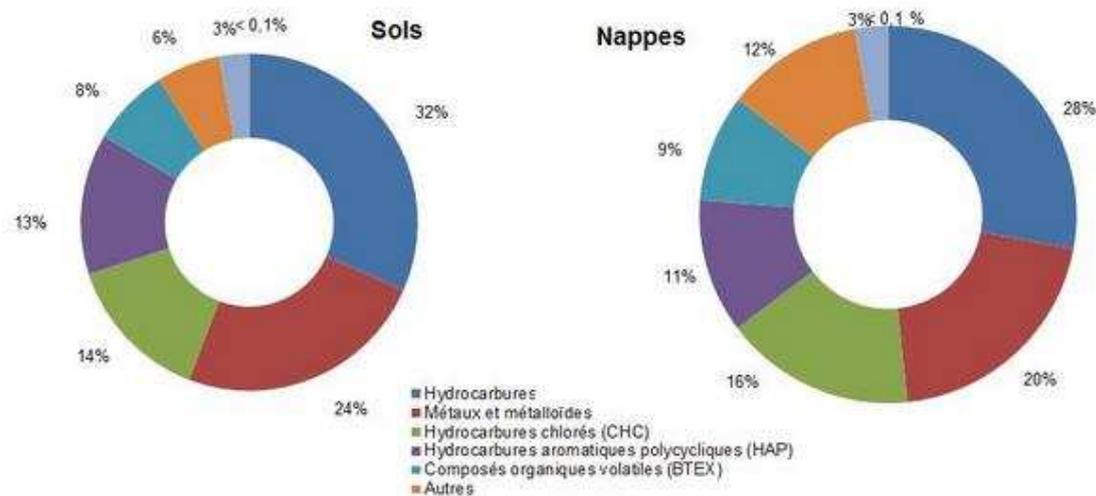


Figure 33 : Répartition des différentes familles de polluants dans les sites contaminés (BASOL, 2015).

Dans les sites pollués, la moitié des polluants détectés dans les sols et les nappes phréatiques sont les hydrocarbures, les métaux et métalloïdes (**Figure 33**). Parmi le groupe des métaux se trouve le Cd^{2+} , classé comme carcinogène probable par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) depuis 1993. Le cadmium est produit notamment par les industries métallurgiques, plasturgiques, les chantiers navals et se retrouve dans les batteries (Luevano et al., 2014). Il peut également se lier aux ions phosphates présents dans

les pesticides et les engrais phosphatés et ainsi contaminer l'eau et les sols et se retrouver dans l'eau de boisson et la nourriture. Ce polluant peut aussi être absorbé lors de la consommation de cigarette (une cigarette contient 2 µg de Cd²⁺).

Les études épidémiologiques démontrent un rôle carcinogène du Cd²⁺ dans les cancers professionnelles du poumon, de la prostate et dans les cancers du sein et du pancréas (Garcia-Esquinas et al., 2014, Li et al., 2011, Strumylaite et al., 2014, Van Maele-Fabry et al., 2016). Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, les concentrations en Cd²⁺ sont plus élevées dans les tissus cancéreux comparés aux tissus sains et également dans le sang et les urines, ce qui montre une bioaccumulation importante. Cette bioaccumulation est due à une absence de métabolisation et à la demi-vie supérieure à 10 ans du Cd²⁺. Ce polluant est un métallo-œstrogène classé parmi les perturbateurs endocriniens. Il est en effet capable de mimer les œstrogènes et d'activer les récepteurs hormonaux ERα. Cette activation des ER entraîne un développement exacerbé de la glande mammaire et de l'utérus *in vivo* ou de cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Byrne et al., 2013, Johnson et al., 2003, Stoica et al., 2000). Sur d'autres modèles cellulaires n'exprimant pas les ER (sein, pancréas et poumon), l'exposition au Cd²⁺ transforme les cellules épithéliales. Au cours de cette transformation, les cellules deviennent invasives en sécrétant plus de MMPs (Benbrahim-Tallaa et al., 2009, Person et al., 2013, Qu et al., 2012).

L'expression et l'activité des canaux ioniques peuvent être perturbées par les polluants environnementaux entraînant la perturbation de mécanismes qui pourrait conduire au développement d'un cancer (Restrepo-Angulo et al., 2010). *In vivo*, l'exposition de muscles lisses pulmonaires de rat à la fumée de cigarette augmente l'expression du canal TRPM7 (Lin et al., 2016). Ce canal est perméable aux ions physiologiques mais également toxiques tels que le Cd²⁺ (Monteilh-Zoller et al., 2003). Nous émettons l'hypothèse que TRPM7 constituerait une voie d'entrée de ce polluant qui entrainerait la transformation des cellules non-cancéreuses. Pour cette étude, nous nous intéressons aux effets sur la capacité invasive de cellules non-cancéreuses de pancréas et de sein exposées de manière chronique au Cd²⁺. TRPM7 est en effet impliqué dans l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo* (Meng, et al. 2013, Clark, et al. 2006, Middelbeek, et al. 2012). De plus, dans les biopsies de cancer du sein, l'expression de TRPM7 est corrélée avec l'index de prolifération (ki67) et la taille de la tumeur mammaire. Ce canal est un marqueur pronostic fiable

indépendant de la taille des tumeurs et de la présence de métastases (Clark et al., 2006, Middelbeek et al., 2012).

3. OBJECTIF

TRPM7 intervient dans le développement embryonnaire et dans le fonctionnement physiologique de plusieurs organes. Son rôle est démontré dans plusieurs processus de cancérogénèse *via* sa fonction canalaire ou kinase. Au laboratoire, nous travaillons sur l'adénocarcinome canalaire pancréatique dont le taux de survie reste très bas. Ce pronostic sombre est dû notamment à une détection du cancer trop tardive souvent à un stade déjà métastatique. Nous cherchons donc à décortiquer les mécanismes impliquant TRPM7 dans la formation des métastases et plus particulièrement l'invasion cellulaire. TRPM7 est également perméable à d'autres ions non-essentiels tels que le Cd^{2+} dont des études épidémiologiques montrent un lien probable entre son exposition et le développement du cancer du sein et du pancréas. Parallèlement, nous étudierons le rôle de TRPM7 dans un autre modèle invasif induit par l'exposition au Cd^{2+} .

Objectif de la thèse : comprendre le rôle de TRPM7 dans l'invasion des cellules d'adénocarcinome canalaire pancréatique et dans un autre modèle de cellules non-cancéreuses ayant acquis un phénotype invasif induit par l'exposition au Cd^{2+} .

MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. *Modèles cellulaires et conditions de culture*

Les cellules utilisées proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont manipulées en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique de type II dans une salle de culture pour éviter tous risques de contaminations. Des tests de détection des mycoplasmes sont réalisés régulièrement. Les lignées MIA PaCa-2 et PANC-1 ont été isolées de carcinome pancréatique alors que les cellules hTERT-HPNE et MCF-10A constituent des modèles cellulaires épithéliaux non-cancéreux de pancréas et de sein. Les cellules sont cultivées dans leur milieu de culture spécifique et dans un incubateur à 37°C en atmosphère contrôlée (95 % d'air, 5 % de CO₂ et saturée en humidité) (**Tableau 10**). Les traitements chroniques avec le Cd²⁺ durent 40 semaines avec 2,5 µM pour MCF-10A et 29 semaines avec 1 µM pour les hTERT-HPNE.

Tableau 10 : Conditions de culture des lignées cellulaires.

Nom de lignées	Origine	Milieu de congélation	Composition du milieu de culture (mL) () : concentrations des solutions
MIA PaCa-2	Carcinome pancréatique Homme caucasien de 65 ans	95% SVF – 5% DMSO	-44,5 mL DMEM High Glucose -5 mL SVF -500 µL glutamine
PANC-1	Carcinome Epithéloïde pancréatique Homme caucasien de 56 ans	95% SVF – 5% DMSO	
hTERT-HPNE	Cellule épithéliale canalaire pancréatique non-cancéreuse Homme caucasien de 52 ans	95% SVF – 5% DMSO	-18,75 mL de DMEM 2X sans glucose -14,25 mL d'eau stérile de culture -12,5 mL de milieu M3 base -2,5 mL de SVF -500 µL de glucose -500 µL de glutamine -1 mL de sodium bicarbonate -5 µL d'EGF (100 µg/mL) -3,75 µL de puromycine
MCF-10A	Cellule épithéliale mammaire non-cancéreuse Femme caucasienne de 36 ans	92,5% SVF – 7,5% DMSO	-44,23 mL DMEM F12 + glutamine -5 mL SVF -500 µL d'hydrocortisone (50 µg/mL) -250 µL d'insuline (2 mg/mL) -10 µL d'EGF (100 µg/mL) -5 µL de toxine cholérique (1 mg/mL)

Les cellules sont conservées dans des cryotubes à -80°C dans 1 mL de milieu spécifique de congélation dont la composition est indiquée dans le **Tableau 10**.

Le protocole de décongélation permet d'éviter que le DMSO (diméthylsulfoxyde) présent à forte concentration, n'entraîne une mortalité cellulaire et gêne la reprise des cellules. Les étapes sont : décongélation du cryotube à température ambiante / reprise de la suspension cellulaire avec 9 mL de milieu de culture chauffé à 37°C / centrifugation 1500 rpm (round per minutes) 3 minutes / Reprise du culot dans du milieu neuf.

1.2. Passage des cellules

Un passage consiste à décoller les cellules adhérentes pré-confluentes (80 %) pour les réensemencer dans d'autres contenants. Les cellules ne doivent pas subir un nombre de passage trop important afin d'éviter une dérive phénotypique et des réponses biologiques aléatoires. Toutes les solutions utilisées sont chauffées au bain-marie à 37°C afin d'éviter un choc thermique aux cellules.

- Après retrait du milieu de culture appauvri, rinçage du tapis cellulaire avec 5 mL de PBS.
- Incubation à 37°C des cellules avec 1 mL de trypsine-EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (1,5 mL pour les MCF-10A) pendant 5 minutes (15 minutes pour les MCF-10A).
- Ajout de 5 mL de milieu neuf qui va neutraliser l'action de la trypsine par un excès de protéine.
- Comptage des cellules en suspension homogène sur lame de Malassez (20 µL). Le nombre des cellules comptées est multiplié par 4 pour obtenir une concentration cellulaire / µL. Le nombre de cellules à ensemercer est divisé par la concentration pour obtenir un volume à prélever en microlitres.

2. EVALUATION DE LA VIABILITE PAR LE TEST MTT

Ce test permet d'évaluer la viabilité cellulaire en mesurant l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Cette enzyme est capable de transformer les sels de tétrazolium jaune du MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl-2,5-diphényltétrazolium bromide) en cristaux bleu violet (le formazan) qui seront dissous dans du DMSO. L'intensité de coloration mesurée au spectrophotomètre à 550 nm reflète le nombre de cellules

métaboliquement actives donc vivantes. Ce test peut être effectué dans plusieurs cas. Il sert d'expérience contrôle lors de différents tests (invasion, zymographie) pour prouver que les variations observées ne sont pas dues à une différence d'ensemencement. Il permet également de mesurer la prolifération des cellules en réponse à des traitements.

- Après élimination du milieu de culture, dépôt sur le tapis cellulaire de 800 µL d'une solution de MTT (0,5 mg/mL de MTT solubilisé dans du milieu de culture sans sérum de veau fœtal) à l'obscurité.
- Incubation pendant 50 minutes à 37°C en atmosphère contrôlée.
- Après retrait de la solution de MTT, solubilisation des cristaux de formazan avec 800 µL de DMSO.
- Répartition de 200 µL (4 puits - plaque 96 puits) pour lecture de la densité optique à 550 nm.

3. ETUDE DE LA MIGRATION ET DE L'INVASION CELLULAIRE EN CHAMBRE DE BOYDEN

L'invasion et la migration cellulaire sont étudiées grâce à l'utilisation d'inserts appelés chambre de Boyden. Ils possèdent une membrane de polyéthylène-téréphtalate (PET) percées de pores de 8 µM de diamètre. Cette membrane est recouverte d'éléments matriciels (Matrigel) pour étudier l'invasion, ou non pour étudier la migration. Pour l'étude de l'invasion cellulaire, les inserts doivent être préparés avant d'être ensemencés. Le matériel utilisé et les solutions doivent être refroidis à 4°C pour éviter la polymérisation du Matrigel. Deux dépôts de solution de Matrigel dans les inserts (50 µg de Matrigel / mL de PBS) sont réalisés à 24 heures d'intervalle. Les inserts peuvent être conservés à -20°C pendant 1 semaine. Les inserts doivent être réhydratés avec du milieu de culture sans sérum de veau fœtal (800 µL dans le compartiment inférieur et 200 µL dans le compartiment supérieur) 2 heures avant d'être ensemencés avec les cellules.

La membrane de PET sépare le compartiment supérieur (où la suspension cellulaire sera déposée à raison de 40 000 cellules (MIA PaCa-2, MCF-10A) et 20 000 cellules (hTERT-HPNE)) du compartiment inférieur contenant du milieu de culture. La capacité migratoire et invasive est évaluée par comptage du nombre de cellules ayant traversé les pores de la membrane et

se retrouvant sur la face inférieure de l'insert. Pour vérifier si la variation observée n'est pas due à un ensemencement différent des inserts, un test MTT est réalisé en parallèle.

Après 24 heures d'incubation en atmosphère contrôlée, les inserts sont colorés selon le protocole suivant : lavage au PBS (5 minutes) / fixation des cellules au méthanol sur la membrane PET (10 minutes) / coloration des cellules à l'hématoxyline (5 minutes). Les inserts sont rincés deux fois à l'eau. Après avoir retiré les cellules dans le compartiment supérieur, les cellules ayant traversé sont comptées sous le microscope au grossissement x40 sur 20 champs au centre de l'insert.

4. BIOLOGIE MOLECULAIRE

4.1. *Surexpression et extinction de l'expression de gènes*

A. *Production des plasmides de surexpression de TRPM7*

- Structure des plasmides

Les plasmides permettant la surexpression de TRPM7 proviennent d'un don du Pr A. Scharenberg (Children's Research Institute and University of WA, Seattle, Washington, USA) à qui j'adresse mes plus sincères remerciements. Pour étudier le rôle de la kinase de TRPM7 dans l'invasion cellulaire, nous allons faire exprimer aux cellules différentes formes de TRPM7 de poisson zèbre : la forme sauvage (TRPM7 Wild type (WT)) et ne contenant plus le domaine kinase (TRPM7 delta kinase) (**Figure 34**). La protéine est fusionnée à une étiquette HA qui permettra sa détection grâce à un anticorps. Les différentes constructions sont clonées dans le vecteur d'expression pcDNA 4/TO au niveau du site multiple de clonage qui peut être ouvert grâce à différentes enzymes listées sur la figure 34.

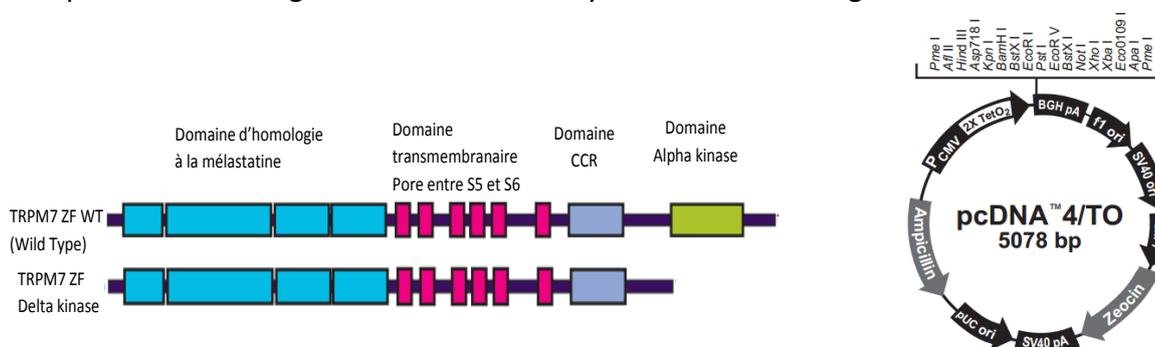


Figure 34 : Constructions de TRPM7 utilisées et plasmide de surexpression.

- Transformation bactérienne

Afin de produire des plasmides en grande quantité, une transformation bactérienne est effectuée. Cette première étape consiste à introduire le plasmide à produire dans des bactéries compétentes traitées par choc salin pour faciliter son incorporation. Elles se multiplieront ensuite en dupliquant leur ADN bactérien mais aussi l'ADN plasmidique. Le protocole consiste à mettre en contact pendant 30 minutes sur glace 100 µL de bactéries *E.coli* Top10 avec 50 nanogrammes (ng) de plasmide pcDNA 4/TO vide ou contenant TRPM7. Un contrôle positif de transfection utilise 0,1 ng de plasmide puc18. Ensuite, les bactéries subissent un choc thermique. Après 45 secondes d'incubation à 42°C, elles sont placées sur la glace pendant 2 minutes. 900 µl de milieu LB Growth à 37°C sont ajoutés à la suspension bactérienne qui est incubée 1 heures à 37°C sous agitation (250 rpm). La suspension bactérienne est ensemencée dans des boites de Pétri contenant du milieu LB gélosé avec 100 µg/mL d'ampicilline. Le plasmide contenant un gène de résistance à l'ampicilline, les bactéries l'ayant incorporé seront sélectionnées car elles seront capables de pousser sur ce milieu gélosé. L'incubation dure une nuit à 37°C. Le lendemain, après avoir contrôlé la présence de colonies dans le contrôle positif, des clones isolés sont prélevés à l'aide d'un cône stérile et mis en culture dans 3 mL de milieu LB Growth contenant 50 µg/mL d'ampicilline.

- Extraction du plasmide

Le plasmide est extrait et purifié à partir d'une suspension bactérienne avec le kit Quiagen Spin Miniprep. Un petit volume de suspension bactérienne (1,5 mL) est d'abord utilisé afin de sélectionner les clones positifs contenant le plasmide. Une fraction de ces suspensions bactériennes, pour les clones positifs, seront diluée au 500^{ième} dans un grand volume de milieu (25 mL) afin d'obtenir une quantité de plasmide plus importante qui sera extraite avec le même kit.

B. Technique de l'ARN interférence et transfection cellulaire

L'ARN interférence est une technique qui a pour but de détruire l'ARNm pour inhiber l'expression de la protéine. Le siRNA est une molécule d'ARN double brin qui va se fixer au complexe RISC contenant une endoribonucléase. Après destruction d'un des deux brins, le brin restant va guider le complexe sur son ARNm cible qui doit avoir une séquence

complémentaire au brin guide. L'ARNm cible sera ensuite détruit, induisant une extinction d'expression de la protéine.

L'électroporation est une technique de transfection permettant grâce à l'application d'un choc électrique de créer des pores dans la membrane plasmique et de faire pénétrer les acides nucléiques. Dans nos études, nous utilisons des ARN interférent (siRNA) contrôle et ciblant un ARNm particulier ou des plasmides de surexpression vide et contenant TRPM7 sauvage ou muté. Ces molécules vont entraîner une modification de l'expression de TRPM7 transitoire. Un shRNA ciblant TRPM7 ou contrôle ont également été utilisés. Un shRNA est un ARN interférent, contenu dans un plasmide, qui va s'intégrer dans le génome dans le but d'effectuer une extinction stable d'une protéine.

Pour réaliser l'électroporation, une partie de la suspension cellulaire correspondant à une quantité de 1 millions de cellules est centrifugée 3 minutes à 1500 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon de transfection contenant les acides nucléiques à transférer.

Les séquences des siRNA sont indiquées dans le **tableau 11**. La quantité utilisée d'ADN ou ARN à transférer est de 2 µg. Le kit de transfection et les programmes d'électroporation (Amaxa) pour les lignées cellulaires sont décrits dans le **tableau 12**.

Tableau 11 : Séquence des ARN interférents (siRNA).

Gène ciblé (Fournisseur)	Séquence du siRNA (5' vers 3')
Control (ThermoFischer)	CUGGACAUGGACCAAGUGGACUU
TRPM7 (ThermoFischer)	GUCUUGCCAUGAAAUACUCUU
Hsp90alpha (kitQiagen)	TGCACTGTAAGACGTATGTAA AACCTGACCATTCCATTATT CAGAATGAAGGAGAACCAGAA ATGGCATGACAACACTTTAA

Tableau 12 : Description des kits et des programmes de transfection selon la lignée cellulaire.

Lignées	Kit (Amaxa)	Programme
MIA PaCa-2	L	X-005 (PANC-1)
hTERT HPNE	L	X-005 (PANC-1)
MCF-10A	L	T-020 (MEF)

Les cellules ne doivent pas rester trop longtemps en contact avec le tampon qui est toxique. Les cellules dans le tampon de transfection avec les si/shRNA ou les plasmides à transférer sont transférées dans une cuve de transfection. Après 3 minutes d'incubation afin que les molécules d'acides nucléiques se déposent sur la cellule, la cuve est mise dans l'électroporateur. 900 µL de milieu de culture à 37°C sont ajoutés dans la cuve et les cellules sont mises à incuber 4 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite transférées dans un volume de milieu de culture à 37°C et sont réparties dans les différents contenants pour les expériences. Les transfections sont validées en RT-qPCR et Western Blot 48 heures après la transfection.

4.2. Extraction d'ARN et PCR

A. Extraction des ARN totaux

L'expression transcriptionnelle des gènes impliqués dans nos différentes expériences est évaluée qualitativement ou quantitativement en temps réel par RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Ces techniques nécessitent l'obtention d'ARN qui seront rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) puis amplifiés par PCR.

L'extraction d'ARN s'effectue à partir de cellules rincées au PBS et conservées à -80°C selon deux formats : soit en tapis cellulaire dans des boîtes soit sous forme de culot de cellules dans des tubes. Les ARN sont extraits en utilisant le protocole commercial fourni avec le TriReagent (protocole décrit pour 1 mL de TriReagent) :

- Nettoyage du matériel et de la paillasse avec la solution RNase Away.
- Ajout de 100 µL de 1-bromo-3-chloropropane sur les cellules sur glace (permettant de limiter l'activité des RNAses).
- Agitation au vortex et incubation à température ambiante pendant 3 minutes.
- Centrifugation 15 minutes à 4°C 12000 rpm.
- Récupération de la phase supérieure (sans prendre l'interphase correspondant aux protéines).
- Ajout de 500 µL d'isopropanol (pour précipiter les ARN) sur glace, incubation de la solution pendant 8 minutes à température ambiante et mélange doucement par retournement 4 fois.
- Centrifugation de 15 minutes à 4°C à 12000 rpm.
- Lavage du culot à l'éthanol 75 %.

- Centrifugation de 5 minutes 4°C à 7500 rpm.
- Retrait de l'éthanol 70% et séchage à température ambiante (jusqu'à ce que le culot passe d'un couleur blanche à translucide).
- Repris du culot d'ARN dans de l'eau stérile sur glace.
- Dosage de la quantité d'ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sur 1 μL d'échantillon)
- Conservation de l'échantillon à -80°C

B. Transcription inverse (RT)

La réaction de transcription inverse correspond à la transformation de l'ARN fragile en ADNc plus solide et amplifiable par PCR. La réaction s'effectue avec 2 μg d'ARN. Le volume d'ARN prélevé est complété jusqu'à 13,20 μL avec de l'eau autoclavée dans un microtube dans la glace. Le volume réactionnel total étant de 20 μL , il reste 6,8 μL de mix à ajouter (dont la composition est indiquée dans le **tableau 13**). Les microtubes sont placés dans le thermocycleur pour la réaction de transcription inverse selon le protocole suivant : 25°C pendant 10 minutes (fixation des primers à l'ARN) - 37°C pendant 2 heures (réaction de polymérisation de l'ADNc) - 85°C pendant 5 minutes (arrêt de la réaction) - 15°C (conservation des échantillons). Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C pour des longues durées.

Tableau 13 : Composition du mix de transcription inverse.

Composant du mix	Volume par échantillon (μL)
Polymérase	1
Inhibiteur de RNase	1
Tampon de réaction (10X)	2
Primers aléatoires (10X)	2
Oligonucléotides (dNTPs)	0,8

C. PCR qualitative

La PCR qualitative permet d'étudier si un gène est exprimé en amplifiant l'ADNc formé à partir l'ARN. 1 μL d'ADNc non dilué est déposé dans un microtube. Le volume réactionnel étant de 50 μL , il reste 49 μL de mix (dont la composition est indiquée dans le **tableau 14**) à ajouter. Les primers permettent d'encadrer le gène d'intérêt permettant son amplification spécifique (**Tableau 15**). Le microtube est ensuite placé dans le thermocycleur pour la réaction de PCR de 40 cycles. Les étapes d'un cycle sont :

- Dénaturation de l'ADNc double brin en simple brin : 94°C / 4 minutes et 94°C / 30 secondes.

- Hybridation des primers : 58°C / 30 secondes.
- Amplification du gène par la polymérase : 72°C / 45 secondes.
- Fin du run de PCR (40 cycles) : 72°C / 4 minutes (conservation des échantillons à 15°C si besoin).
- Dépôt de 10 µL d'un mélange amplicon + tampon de charge dans un gel contenant 1,5 % d'agarose et 3 % de BET (Bromure d'Ethydium – agent intercalent fluorescent de l'ADN).
- Migration pendant 15 minutes à 100 volts dans du tampon TEA 0,5 X.
- Détection des amplicons sous lumière ultraviolette.

Tableau 14 : Composition du mix de PCR qualitative.

Composant du mix	Volume par échantillon (µL)
eau	36,2
Tampon de réaction 10X (sans MgCl ₂)	5
MgCl ₂ 50 mM	1,5
10 mM dNTPs mix	1
Primer forward (5 µM)	2,5
Primer reverse (5 µM)	2,5
Taq polymerase	0,3

Tableau 15 : Liste des primers.

Gène	Séquences (5' vers 3')	Taille de l'amplicon (bp)
TRPM7	R : CCGTTGGGCTCTGTTC F : AGTTCCAAGGACCCTC	204
TRPM7 ZF	F : ACCAAAGCGGAAATGT R : GGCGTAGAACTTGCGTG	212
Actine	F : CAGAGCAAGAGAGGCATCCT R : ACGTACATGGCTGGGGTG	226
Hsp90alpha ARNm 1	F : GCCTTCAGACAGAGCCAAGGT R : TCT TGGGTCTGGGTTTCTCA	101
Hsp90alpha ARNm 2	F : CGTCAGTTGCTTCAGCGTCC R : TCAACTGGGCAATTTCTGCCT	151

D. PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative permet de mesurer précisément l'expression du gène grâce à l'obtention d'une valeur appelée Ct (cycle threshold) qui correspond au cycle où la fluorescence émise par le SyberGreen, l'intercalant fluorescent s'incorporant dans l'ADN, est assez forte pour dépasser le seuil de détection. Plus la quantité d'ADNc au départ est importante

(correspondant à la quantité d'ARNm et donc l'expression d'un gène), moins il faudra de cycle pour que la fluorescence émise dépasse le seuil. L'expression du gène est donc inversement proportionnelle au Ct. Ce Ct ne donne pas de concentration d'ARN mais est comparé à une condition contrôle et permet d'obtenir un rapport normalisé dont le contrôle est fixé à 1. Ce Ct est également rapporté à un Ct d'un gène de référence dont l'expression est stable dans les différentes conditions (permettant de savoir si la même quantité d'ADNc est déposée dans le puits en fonction des différentes conditions).

2 µL d'ADNc dilué au 1/20 dans de l'eau autoclavée sont déposés dans une plaque 96 puits. Le volume réactionnel étant de 10 µL, il reste 8 µL de mix à ajouter dans la plaque (dont la composition est indiquée dans le **tableau 16**). Après avoir celi la plaque avec un film plastique pour éviter l'évaporation des échantillons, elle est placée dans le thermocycleur QS5 pour la réaction de 45 cycles de PCR selon le protocole suivant (**Figure 35**).

Tableau 16 : Composition du mix de PCR quantitative.

Composant du mix	Volume par échantillon (µL)
eau	2
Primer Forward (F) 10 µM	0,5
Primer Reverse (R) 10 µM	0,5
Master Mix	5



Figure 35 : Description d'un cycle de réaction de PCR.

Le cycle de PCR comprend plusieurs phases :

- Activation de la polymérase (hold stage) : 95°C / 5 minutes.
- Amplification de l'ADN (PCR stage) : 45 cycles de 4 étapes.

- Dénaturation de l'ADN double brin en simple brin : 95°C / 10 secondes.
 - Hybridations des primers : 60°C / 15 secondes.
 - Synthèse de l'amplicon : 72°C / 20 secondes.
 - Mesure de la fluorescence en fin de cycle (mesure du Ct).
- Obtention du pic de fusion spécifique de l'amplicon (melt curve stage).
- Dénaturation des brins d'ADN néosynthétisé : 95°C / 5 secondes.
 - Renaturation des brins d'ADN néosynthétisé : 60 °C / 1 minute.
 - Hybridation progressive des brins d'ADN : augmentation de la température progressive jusqu'à 97°C (détection continue de la fluorescence).

La température de fusion correspond au moment où 50 % de l'ADN est double brin et où on obtient une chute de la fluorescence et la dérivée de cette chute permet d'obtenir un pic de fusion spécifique de chaque amplicon. Pour pouvoir analyser des résultats de PCR, il faut que :

- l'efficacité des primers soit située entre 1,8 et 2.
- la réaction de PCR n'est amplifiée qu'un amplicon par couple de primers (se traduisant par un seul pic de fusion).
- le Ct du gène dans le contrôle négatif (de l'eau à la place de l'échantillon d'ADNc) soit nul ou très élevé.

4.3. Modification de gènes par la technique des ciseaux moléculaires CRISPR/Cas9

A. Principe de la technique et stratégie

Ce système est dérivé d'un système de défense bactérien contre les infections phagiques. Le bactériophage va injecter son ADN dans la bactérie. L'ADN phagique contient des séquences particulières PAM (NGG). La bactérie va copier une courte séquence de l'ADN phagique en amont de la séquence PAM et l'insérer son génome pour garder en mémoire l'infestation. Si la bactérie est en contact une deuxième fois avec ce phage, elle va synthétiser des ARN complémentaires de l'ADN phagique. Pour dégrader l'ARN phagique, cet ARN complémentaire spécifique (single guide RNA) se couple à une ARN traceur qui va fixer la nucléase Cas9. La Cas9 effectue une coupure double brin et détruit l'ADN phagique. Les

séquences PAM ne sont pas présentes dans la bactérie pour éviter qu'elle ne dégrade son propre ADN.

Au laboratoire, nous utilisons le système CRISPR/Cas9 pour modifier le génome d'une cellule vivante pour y introduire des mutations qui vont permettre d'invalider un gène. L'ARN traceur (sur la **figure 36** en bleu) guidant la cas9 est réuni artificiellement par une séquence en forme de boucle (GAAA) à un ARN spécifique de la séquence à détruire appelé single guide RNA (représenté en vert sur la figure 33 et dont on a défini la séquence de 23 nucléotides). Ce système de coupure double brin ciblée stimule la recombinaison homologue entre le génome et le plasmide. Il permet d'introduire dans le génome une mutation ou une séquence pour arrêter la transcription du gène notamment.

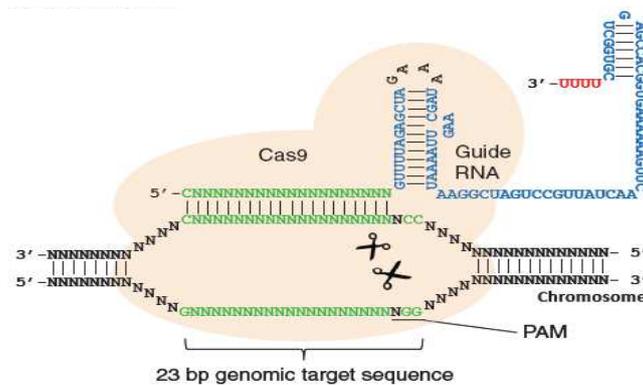


Figure 36 : Schéma du système CRISPR/Cas9.

L'ARN traceur permet de guider la nucléase Cas9. La séquence GAAA lie l'ARN traceur à une séquence d'ARN spécifique de la séquence où la coupure double brin doit être réalisée (single guide RNA). L'ARN traceur et l'ARN spécifique constitue l'ARN guide (single guide RNA).

Le canal TRPM7 est impliqué dans les mécanismes de cancérogénèse et plus particulièrement régule l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. Mais nous ne savons pas quelle partie de la protéine est impliquée dans ce mécanisme. Nous émettons l'hypothèse que la kinase de TRPM7 serait impliquée. Pour inhiber la fonction kinase de TRPM7, il n'existe que des modulateurs pharmacologiques peu spécifiques. La stratégie CRISPR/Cas9 vient en complément de la stratégie de surexpression de TRPM7 (WT ou delta kinase). En effet, la stratégie de surexpression n'est pas idéale car la surexpression de protéines exogènes altère le fonctionnement de la cellule et peut entraîner une cytotoxicité. L'outil CRISPR-cas9 nous permettrait d'invalider directement le domaine kinase endogène dans les cellules cancéreuses selon la stratégie décrite en **figure 37**.

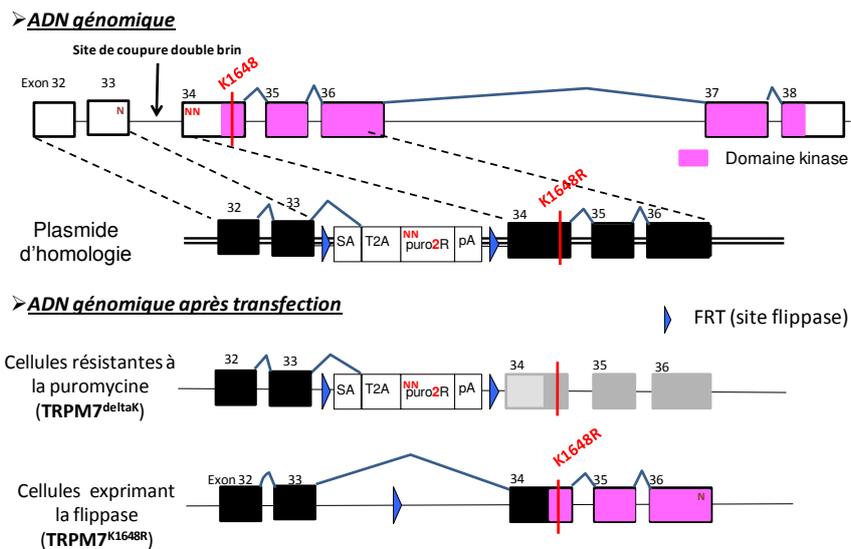


Figure 37: Stratégie d'inactivation du domaine kinase de TRPM7 par CRISPR/Cas9.

Les zones en pointillés correspondent aux homologies de séquence entre l'ADN génomique et le plasmide d'homologie qui vont permettre une insertion du gène de résistance à la puromycine contenant deux bases supplémentaires (NN) afin de conserver le cadre de lecture. La cassette contient un site donneur d'épissage (SA) qui va permettre de transcrire le gène, un site T2A codant un peptide de clivage qui va permettre de former 2 protéines distinctes (TRPM7 et la protéine de résistance à la puromycine) et un terminateur de transcription (pA) qui permet la transcription de TRPM7 sans son domaine kinase. En clivant de part et d'autre de la cassette, la flippase va permettre l'élimination de la cassette permettant la transcription de TRPM7 portant une mutation invalidante du domaine kinase (K1648R).

Le domaine kinase de TRPM7 est situé de la fin de l'exon 34 jusqu'à l'exon 38. La coupure double brin s'effectue dans l'intron situé entre l'exon 33 et 34. Grâce aux homologies de séquences entre le génome et le plasmide d'homologie, le gène de résistance à la puromycine (puroR) est intégré dans le génome. L'incorporation de ce gène va permettre de sélectionner les cellules mutées en les mettant en contact avec une concentration de puromycine létale pour les cellules non mutées. Deux nucléotides sont ajoutés dans la séquence de la cassette de résistance à la puromycine (NN). Ces nucléotides permettent de rester en phase avec le cadre de lecture qui se fait par codon (3 bases) car l'exon 33 précédent se termine sur une seule base (N). Ainsi, quand on va insérer la cassette dans le génome, le cadre de lecture ne sera donc pas perturbé et la puromycine sera transcrite et traduite. La cassette intégrée au génome contient également un site donneur d'épissage (SA) qui va permettre de transcrire le gène, un site T2A codant pour un peptide de clivage qui va permettre de former 2 protéines distinctes (la protéine de résistance à la puromycine

et TRPM7). Elle contient également un terminateur de transcription (pA) qui indique l'arrêt de la transcription par la polymérase. Dans les cellules résistantes à la puromycine, le domaine kinase est délété (donc ni transcrit ni traduit). La cassette est entourée de sites cibles pour la flippase. La flippase coupe sur ses sites spécifiques et retire la cassette et permet d'exprimer la kinase avec une mutation invalidante (mutation K1648R) qui est introduite dans le génome *via* le bras homologue droit (Schmitz et al., 2003).

B. Design des outils moléculaires

a. Bras homologues

Le design s'effectue en se basant sur la séquence génomique humaine de TRPM7. Avant de pouvoir commencer le design des outils, il faut avoir une idée de la stratégie et surtout de la localisation du site de coupure double brin qui doit se faire dans un intron pour éviter de perturber le cadre de lecture. Les bras homologues doivent respecter trois critères :

- la distance minimum entre le site de coupure double brin et le début du bras homologue doit être de 100 nucléotides minimum.
- la longueur du bras homologues doit être comprise entre 500 et 1000 paires de bases pour favoriser l'incorporation de la cassette dans le génome.
- la séquence du bras ne doit pas contenir de site pour les enzymes de restriction qui vont permettre de les extraire des plasmides commerciaux (sinon le bras homologue sera dégradé lors du clonage). L'analyse des sites de restriction se fait grâce au logiciel NEB cutter V2.0. Si on retrouve des sites dans les bras, 3 solutions sont possibles : décaler le bras homologues pour ne plus avoir le site de restriction, choisir une autre enzyme de restriction pour sortir le bras du plasmide commercial. Si les deux premières solutions ne sont pas possibles, il faut créer des sites de restriction dans les séquences des bras homologues par PCR.

b. Single guide RNA

Le single guide contient une séquence d'ARN de 23 nucléotides. Son design va permettre de cibler la séquence qui sera clivée par la nucléase Cas9. Le design s'effectue grâce au logiciel CRISPOR. Après avoir copié dans la barre de recherche du site la séquence du site de coupure double brin, le logiciel va donner les différentes séquences PAM possibles

auxquelles s'accroche la nucléase cas9 dans le sens normal et inverse de lecture de l'ADN (car la Cas9 peut s'accrocher sur le brin dans le sens de lecture (forward) ou inverse (reverse)). Il faut ensuite choisir le single guide RNA parmi une liste avec un code couleur (vert, jaune et rouge) qui indique la qualité du single guide RNA. La qualité s'évalue sur la plus faible probabilité d'aller couper à d'autres endroits que celui voulu dans la stratégie. Cette qualité prend en compte plusieurs facteurs :

- Score de spécificité : la séquence visée ne se retrouvera pas ailleurs dans le génome (plus le score est haut, plus le guide est spécifique).
- Prédiction des séquences off targets : ce score doit être le plus bas possible surtout dans les exons (il s'agit des prédictions de coupure possibles non désirées sur d'autres gènes).
- Fréquence des mutants : doit être en dessous de 5 % pour éviter de perturber l'interaction entre le guide et sa séquence cible à cause de mutations.
- Ratio efficacité de coupure (en pourcentage) doit être le plus haut possible.

C. Production des outils moléculaires

a. Protocoles utilisés pour la production des plasmides

La **transformation bactérienne** est une étape essentielle qui va permettre dans un premier temps de produire en grande quantité les plasmides. La quantité d'ADN à incorporer dans les bactéries est différente pour un plasmide commercial et fabriqué au laboratoire. Pour un plasmide commercial, la quantité est de 100 ng correspondant à environ un volume de 1 μ L. Pour un plasmide construit au laboratoire, plusieurs microlitres d'ADN sont utilisés pour augmenter la probabilité de faire rentrer le plasmide dans la bactérie (à cause d'une taille plus importante comparé au plasmide commercial). Les plasmides sont extraits des bactéries grâce au kit fourni par Macherey-Nagel.

La **digestion des plasmides** est utilisée dans différents cas :

- Sortir les inserts contenus dans les plasmides commerciaux (par exemple pour sortir les bras homologues gauche et droit).
- Récupérer les vecteurs ouverts pour ensuite les liguer avec les inserts (qui correspondent à la construction des outils).

La quantité d'ADN digéré dépend de la taille du fragment à récupérer comparée à la taille du vecteur qui le contient (entre 1 et 10 µg voire plus si on n'arrive à récupérer assez d'ADN). Si le fragment est petit, il faudra digérer plus d'ADN car après la digestion, la proportion du fragment à récupérer correspond à un faible pourcentage de la construction digérée. Pour effectuer la digestion, mélanger :

- l'ADN à digérer (si le volume est trop grand on peut évaporer au bain-marie pour obtenir le volume souhaité).
- le tampon des deux enzymes (10X, à diluer 10 fois dans le volume réactionnel total) qui vont couper l'insert à gauche et à droite (chaque enzyme possède un tampon dans laquelle elle est la plus active – veillez à ce que le tampon utilisé soit compatible pour les deux enzymes sinon il faut le faire en deux étapes).
- chaque enzyme (2 µL de chaque, doivent être diluées 2 fois pour être actives pour diluer le glycérol dans lequel elles sont conservées). Une unité enzymatique permet de digérer 1 µg d'ADN pendant 1 heure à 37°C. Donc pour digérer 10 µg, les enzymes étant à 10 unités/µL, 1 µL suffit (2 µL sont ajoutés pour s'assurer de l'efficacité de la réaction).
- de l'eau RNAses-DNases free (pour compléter jusqu'à 20 µL, volume réactionnel total).

La digestion dure entre 1 et 2 heures à 37°C puis le produit de digestion est laissé à température ambiante. La totalité de la réaction de digestion est déposée dans un gel d'agarose (1 %) contenant 3 % de BET. Le marqueur de taille et le plasmide non digéré sont également déposés. Les échantillons sont mélangés avec du tampon de charge pour les densifier et permettre leur dépôt. La migration dure 15-30 minutes à 150 volts. Une fois la migration effectuée, le morceau de gel contenant le fragment d'intérêt est découpé sous une lampe UV.

L'extraction des ADN plasmidiques ou des inserts à partir du gel d'agarose s'effectue selon le protocole suivant :

- Dissoudre le gel dans un bain-marie à 60°C dans du tampon NT1 (200 µL pour 0,1 g de gel) jusqu'à ce que le tampon vire du bleu au jaune.
- Déposer l'échantillon sur une colonne (peut retenir au maximum 25 µg d'ADN).
- Centrifuger 11 000 g pendant 30 secondes.

- Laver la colonne deux fois avec 700 µl de tampon NT3 en centrifugeant 11 000 g pendant 30 secondes pour faire passer le liquide au travers de la colonne.
- Centrifuger à 11 000 g pendant 2 minutes pour sécher la colonne.
- Déposer de l'eau chauffée à 60°C RNAses-DNases free pour éluer d'ADN retenu sur la colonne.
- Après 1 minute d'attente, centrifuger à 11 000 g pendant 2 minutes pour récupérer l'ADN dans un tube propre.
- Mesurer la quantité d'ADN digérée et extraite du gel au spectrophotomètre.

La **ligation** permet de construire les outils nécessaires à la stratégie CRISPR/Cas9 : le plasmide d'expression contenant le single guide ARN et le plasmide d'homologie contenant les bras homologues et la cassette de résistance à la puromycine. La quantité d'ADN totale (vecteur + insert) est de 100 ng (voire 200 ng si la ligation échoue). La formule suivante est utilisée pour calculer la quantité d'insert à apporter dans le mélange pour augmenter la probabilité de succès de la ligation :
$$\frac{[(\text{ng de vecteur} \times \text{taille insert (kb)}) / \text{taille vecteur (kb)}] \times 3}{= \text{ng d insert}}$$
. Cette formule n'est pas prise en compte si le vecteur est très petit. Par exemple, pour faire rentrer le single guide ARN dans le vecteur, 1 µL d'insert et environ 100 ng de vecteur sont utilisés. Le mélange réactionnel (20 µL environ) contient en plus de l'ADN, du tampon de ligase 10X (à diluer 10 fois), la ligase (1µL) et de l'eau. La ligase étant active à 16°C, le tube est laissé 1 nuit à température ambiante.

Deux réactions sont réalisées : une avec l'insert (ligation) et sans l'insert (contrôle négatif) pour montrer que les colonies qui poussent sont bien celles qui ont intégré la cassette et pas seulement le vecteur refermé sur lui-même. S'il y a présence de nombreux faux positifs, le nombre de colonies à tester au séquençage pour vérifier la présence de l'insert sera augmenté.

Le séquençage permet de vérifier l'incorporation de l'insert dans le vecteur afin de valider les clones et de lancer des maxi-cultures bactériennes pour récupérer le plasmide en grande quantité. Des dilutions des plasmides (30-50 ng de plasmide par µL) sont effectuées afin d'envoyer à la société GATC. Le séquençage demandé est un séquençage de Sanger sur ADN purifié. Il faut renseigner ensuite des caractéristiques sur le séquençage :

- Taille du séquençage : < 5 Kb

- Indiquer un point de départ au séquençage (sélection d'un primer spécifique d'une séquence contenue dans le plasmide). Ce choix est très important car il ne doit pas être trop loin de la séquence à vérifier pour être contenu dans les 5 kb ni trop près car les 30 premiers nucléotides entre le primer et le séquençage ne sont pas analysables.

Pour valider les clones, le résultat du séquençage est ouvert dans le logiciel ApE, la séquence de l'insert est renseignée dans la barre de recherche pour aligner cette séquence dans celle du plasmide séquencé. Si un alignement est trouvé, le clone bactérien est positif et contient le plasmide complet (insert + vecteur). Une autre méthode pour vérifier l'insertion de l'insert est possible. On peut effectuer une PCR avec une amorce sur le vecteur et une sur l'insert.

b. Génération des outils

- Génération du plasmide d'expression du single guide ARN et de la nucléase Cas9

Le plasmide d'expression de la nucléase Cas9 est un plasmide commercial qui sera produit directement en grande quantité grâce à la transformation bactérienne.

La molécule double brin du single guide ARN est produite selon le protocole suivant :

- Phosphoryler les séquences simples brins 30 minutes à 37°C pour faciliter leur incorporation dans le vecteur déphosphorylé (à l'aide d'une kinase et de son tampon spécifique).
- Générer le single guide ARN double brin en hybridant les séquences forward et reverse (dilués à 100 µM) en mélangeant 1 µL de chaque amorce à 6,5 µL d'eau, 1 µL de tampon de ligase et 0,5 µL de ligase.
- Chauffer le mélange 5 minutes à 95°C pour détruire les structures secondaires et les appariements partiels entre les séquences qui pourraient empêcher l'hybridation.
- Arrêter le bloc chauffant et le laisser refroidir lentement jusqu'à 25°C. La température va passer par la température optimale où les deux simples brins vont s'hybrider.

Le single guide RNA va être clonée dans un vecteur Topo. Ce plasmide est une construction de nos collaborateurs à Lille à qui j'adresse mes sincères remerciements. Ce plasmide

contient un site de clonage pour l'enzyme BbSI, il faut donc ajouter aux extrémités du single guide RNA, les séquences complémentaires à celles générés dans le plasmide ouvert par BbSI pour que le single guide RNA s'insère dans le plasmide par complémentarité de leurs extrémités. Pour que le single guide RNA s'exprime, il faut rajouter un G entre l'extrémité cohésive de BbSI et la séquence de 23 nucléotides pour que la polymérase puisse se fixer sur le promoteur U6 et démarrer la transcription. La boucle d'ADN permettant de recruter la cas9 (ARN traceur) sera exprimé derrière la séquence spécifique du single guide ARN.

Le single guide RNA est ligué dans le vecteur Topo selon le protocole suivant :

- Effectuer la ligation entre l'insert (le single guide ARN double brin phosphorylé contenant les extrémités cohésives de l'enzyme BbSI) et le vecteur Topo digéré par BbSI (phosphorylé pour éviter qu'il ne se referme sui lui-même) (ne pas oublier d'effectuer le contrôle négatif sans insert)
- Transformer les bactéries avec le produit de ligation
- Effectuer une mini-culture des clones isolés et séquencer leur ADN plasmidique
- Effectuer une maxi-culture d'un clone positif au séquençage

➤ Génération du plasmide d'homologie

Le but est de construire un plasmide avec les deux bras homologues et la cassette de résistance à la puromycine par clonage selon différentes étapes :

- Amplifier les plasmides commerciaux et en extraite les inserts (bras homologues gauche et droit).
- Amplifier le vecteur qui va contenir les deux bras homologues.
- Obtenir le plasmide d'homologie contenant les deux bras homologues en clonant un bras à la fois.

D. Transfection des clones

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits pour être à 50-70 % de confluence le lendemain (correspond à 300 000 cellules pour MIA PaCa-2 et 400 000 pour PANC-1). La transfection est réalisée 24 heures après l'ensemencement. La quantité de plasmide totale à transférer grâce à la lipofectamine est de 2 µg par puits (les solutions d'ADN concentrés sont dilués à des concentrations de 1 µg/µL pour ne pas pipeter des volumes trop faibles) :

- 0,5 µg de plasmide exprimant la nucléase Cas9 couplé à la GFP (green fluorescent protein) (qui permettra d’observer les cellules transfectées en vert).
- 0,5 µg du plasmide d’expression du single guide RNA dirigé contre la kinase de TRPM7 ou la séquence AAVSI qui sert de contrôle négatif (le site AAVSI est un site naturel d’insertion de génome viral dans les cellules eucaryotes localisé dans l’intron du chromosome 19, l’incorporation d’ADN dans cette zone ne perturbe pas les cellules).
- 1 µg de plasmide d’homologie (couplé à la GFP pour le contrôle négatif AAVSI qui permettra d’observer les cellules transfectées fluoresçant en vert ; ce couplage n’est pas possible pour le plasmide d’homologie de TRPM7 car il serait trop gros s’il contenant à la fois la séquence de TRPM7 et de la GFP).

Deux plaques 6 puits sont transfectées selon le schéma suivant (la plaque est doublée afin que la probabilité d’obtenir des clones isolés résistants et mutés soit plus importante) **(Tableau 17 et 18)**.

Tableau 17 : Plan d’une plaque pour les transfections CRISPR/Cas9.

Puit contrôle AASVI	Puit contrôle AAVSI	Puit contrôle négatif Sans plasmide
Puit expérience TRPM7	Puit expérience TRPM7	Puit expérience TRPM7

Tableau 18 : Composition des mix de transfection selon les expériences CRISPR/Cas9.

Puits	Composition des mix de transfection
Puit contrôle négatif Sans plasmide (2 puits)	<p><u>Mélange 1 :</u> -13,2 µL de lipofectamine 3000 Reagent (6,6µL/ puits) -236,8 µL OptiMeM medium (118,4 µL / puits)</p> <p><u>Mélange 2 :</u> -4 µL de lipofectamine (4 µL/puits) -242 µL OptiMeM medium (121 µL/puits)</p>
Puit contrôle AAVSI (4 puits)	<p><u>Mélange ADN (2 µg) :</u> -2,2 µL de plasmide cas9-GFP (0,5 µL /puits) -4,4 µL de plasmide single guide ARN AAVSI (1 µL/puits) -4,4 µL de plasmide donneur d'homologie pour le site AAVSI (1 µL/puits) =11 µL total</p> <p><u>Mélange 1 :</u> -29,04 µL (26,4 +2,64 µL 10% d'erreur pour les pipetages) de lipofectamine 3000 Reagent (6,6µL/ puits) -505,56 µL ([469,6 + 46,96]-11µL) d'OptiMeM medium (117,4 µL/ puits)</p> <p><u>Mélange 2 :</u> -17,6 µL (16+1,6µL) de lipofectamine (4 µL/puits) -532,4 µL (484+48,4 µL) d'OptiMem medium (121 µL/puits)</p>
Puit expérience TRPM7 (6 puits)	<p><u>Mélange ADN (2 µg) :</u> -3,3 µL de plasmide cas9-GFP (0,5 µL /puits) -6,6 µL de plasmide single guide TRPM7 (1 µL/puits) -6,6 µL de plasmide donneur d'homologie pour la kinase de TRPM7 (1 µL/puits) =16,5 µL total</p> <p><u>Mélange 1 :</u> -43,25 µL (39,6 +3,69 µL) de lipofectamine 3000 Reagent (6,6µL/ puits) -758,34 ([704,4 + 70,44]-16,5µL) d'OptiMeM medium (117,4 µL/ puits)</p> <p><u>Mélange 2 :</u> -26,4 µL (24+2,4µL) de lipofectamine (4 µL/puits) -798,6 µL (726+72,6 µL) OptiMeM medium (121 µL/puits)</p>

Après avoir vortexé les solutions, les composants du mélange 1 et 2 sont incubés 5 minutes à température ambiante. Après avoir été mélangé par pipetage et reflux, les deux mélanges sont incubés ensemble entre 45 minutes à 1 heure à température ambiante (plus les plasmides sont gros plus le temps nécessaire augmente). 250 μ L sont ensuite déposés dans chaque puits de culture contenant les cellules adhérentes dans 1 mL de milieu.

E. Sélection des cellules par la résistance à l'antibiotique

Une courbe dose-effet de l'antibiotique est effectuée sur les cellules afin de déterminer la dose létale minimum en effectuant un test MTT pour déterminer la viabilité cellulaire (**Tableau 19**). Après 48-72h de transfection, les cellules sont observées au microscope à fluorescence pour voir les cellules exprimant la GFP (correspondant à l'expression transitoire de la nucléase Cas9). Si un nombre suffisant de cellules sont positives (correspondant à l'émission d'une fluorescence verte), les cellules sont traitées à la puromycine afin d'isoler les clones résistants car ils auront intégré la cassette de résistance à la puromycine dans leur génome. Les cellules sont observées toutes les 24 heures et rincées avec du PBS pour enlever les cellules mortes. Dans le contrôle négatif, toutes les cellules doivent mourir car elles ne contiennent pas le plasmide avec la cassette de résistance à la puromycine. Une fois que les clones résistants sont isolés, la concentration sera diminuée pour maintenir la pression de sélection sans induire une éjection du plasmide par les cellules. Seulement les clones dans le contrôle AAVSI seront fluorescents car le plasmide d'homologie inséré dans le génome contient la GFP.

Tableau 19 : Conditions de sélection des clones à la puromycine.

Lignées cellulaires	Conditions de traitement puromycine	Dose de maintien de la pression de sélection
MIA PaCa-2	2 μ g/mL – 96 heures	0,5 μ g/mL
PANC-1	5 μ g/mL – 5 jours	0,5 μ g/ μ L

Les clones isolées sont ensuite repiqués dans des plaques 24 puits (1 clone = 1 puits). Une fois que les cellules se sont suffisamment multipliés, chaque clone est transféré dans un puits de plaque 6 puits pour augmenter la quantité de cellules. Après 1 semaine, chaque puits estensemencé dans une flasque 25 cm² et le reste est utilisé pour les analyses génomiques et protéiques pour valider la présence de la mutation.

F. Validation des clones

➤ Au niveau génomique :

Des primers ciblant l'exon 33 (forward) et le domaine kinase au niveau de l'exon 34 (reverse) sont choisis pour valider par PCR si le domaine kinase n'est plus exprimé dans les cellules. Si l'amplicon n'est plus visible ou diminué par rapport aux cellules contrôles AAVSI, c'est que le système CRISPR-Cas9 a permis l'insertion de la cassette et l'arrêt de la transcription avant le domaine kinase.

➤ Au niveau protéique :

L'anticorps dirigé contre TRPM7 (utilisé en Western Blot au laboratoire) cible le domaine carboxylique où se situe le domaine kinase. Des Western Blot sont réalisés sur des clones contrôles et sélectionnés par l'antibiotique. Si l'intensité de la bande spécifique de TRPM7 dans les cellules mutées est diminuée comparées au contrôle, c'est que le système CRISPR-Cas9 a permis l'insertion de la cassette et l'expression d'une protéine sans domaine kinase.

5. IMAGERIE CELLULAIRE : ETUDE DES CONCENTRATIONS IONIQUES

CYTOSOLIQUES

5.1. Principe

L'imagerie cellulaire est une technique d'étude qui utilise des sondes fluorescentes spécifiques pour mesurer les variations ioniques cytosolique dans les cellules en temps réel. Les sondes contiennent des fluorochromes qui absorbent une longueur d'onde spécifique d'excitation qui vont augmenter leur niveau d'énergie. Les fluorochromes vont revenir à leur état basal en émettant un signal fluorescent à une autre longueur d'onde d'émission. Les sondes étant sensibles à la lumière, les protocoles d'imagerie sont effectués à l'obscurité. Au laboratoire, nous nous intéressons à l'homéostasie du Ca^{2+} et du Mg^{2+} . La fixation de ces ions sur les sondes modifie leur environnement électrique, ce qui se traduit par une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. Les sondes sont excitées par deux longueurs d'onde selon leur état libre ou liée à l'ion et possèdent une longueur d'onde d'émission. Quand le ratio entre la fluorescence de la forme liée sur celle de la forme libre augmente, cela signifie que la concentration cytoplasmique de l'ion a augmenté.

5.2. Dispositif expérimental d'imagerie

Le microscope utilisé est un inversé à fluorescence de type Zeiss (Axiovert 200). Le microscope est couplé à un polychromateur (polychrome V, Till photonics) permettant de choisir la longueur d'onde d'excitation des cellules grâce à un système de miroir. La camera CCD (Cool Snaps HQ2, photometrics) permet d'enregistrer l'émission de fluorescence suite à l'excitation de la sonde. Le logiciel d'acquisition utilisé est MetaFluor (version 7, Meta Imaging).

5.3. Préparation des cellules et du milieu d'imagerie

Les cellules sont cultivées dans les boîtes 25 mm² avec 1,5 mL de milieu sur des lamelles de verres (car le plastique des boîtes de culture classique émet de la fluorescence) préalablement nettoyées à l'alcool 70 % et rincées au PBS. Les cellules sont ensuite incubées (« chargées ») avec 3,3 µM de forme perméante de la sonde fluorescente contenant un groupement AM (acetoxymethyl-ester) pendant un temps variable en fonction des lignées cellulaires (**Tableau 20**). La sonde va pénétrer dans la cellule et être prise en charge par les estérases qui dégradent le groupement AM pour que la sonde ne puisse plus traverser la membrane basale. Le temps d'incubation doit être respecté afin que la sonde reste au niveau cytoplasmique et ne soit pas internalisée dans les organites. Les cellules sont perfusées sous le microscope avec du milieu extracellulaire de composition connue proche des caractéristiques du milieu de culture au niveau de l'osmolarité et du pH (**Tableau 21**).

Tableau 20 : Temps d'incubation des sondes en fonction de la lignée cellulaire.

Lignées cellulaires	Temps d'incubation de la sonde	
	Fura2-AM (Ca ²⁺)	MAG Fura2-AM (Mg ²⁺)
MIA PaCa-2	45 min	40 min
hTERT HPNE	35 min	30 min
MCF 10A	45 min	40 min

Tableau 21 : Composition du milieu extracellulaire pour les expériences d'imagerie.

Composant du milieu pH = 7,4	Concentration (mM)	Quantité (g/L)
NaCl	145	8,474
KCl	5	0,373
Hepes	10	2,383
Glucose	5	0,901

Le milieu extracellulaire est conservé à 4°C et est utilisé sur les cellules lors des expériences à température ambiante. Le milieu extracellulaire de base est supplémenté avec 2 mM de Ca^{2+} et 1 mM de Mg^{2+} .

5.4. Etude de l'entrée cationique basale (Quenching au Mn^{2+})

Cette technique indirecte étudie l'implication des canaux ioniques dans l'entrée d'ions dans la cellule (notamment le Ca^{2+}). Elle utilise la propriété de certains cations à éteindre la fluorescence de la sonde appelée quenching. Le Mn^{2+} possède une constante d'affinité pour la sonde Fura-2AM plus élevée que le Ca^{2+} . Ainsi, pour une même concentration de Ca^{2+} et de Mn^{2+} , la sonde fixera préférentiellement le Mn^{2+} . De plus, la fixation du Mn^{2+} sur la sonde entraîne l'extinction de la fluorescence.

Les cellules, préalablement incubées avec la sonde Fura-2AM, sont perfusées sous le microscope avec du milieu extracellulaire supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+} pendant 60 secondes, ce qui permet de stabiliser la fluorescence. Le tracé peut légèrement diminuer due à une extinction naturelle de la sonde appelée bleaching. La longueur d'onde d'excitation (360 nm) ne correspond ni à celle de la forme libre ou liée mais au point isobestique. A cette longueur d'onde, l'émission de fluorescence est indépendante de la concentration en Ca^{2+} cytosolique. En effet, on ne cherche pas à mesurer une concentration ionique cytosolique mais à évaluer le passage des cations dans la cellule. Les cellules sont perfusées pendant 2 minutes avec du milieu où le Ca^{2+} est remplacé par 2 mM de Mn^{2+} .

Pour calculer la pente d'extinction (quench) pour chaque cellule à partir de la trace obtenue, on choisit le temps T où l'extinction due au Mn^{2+} commence. Le coefficient directeur A de la droite est calculé 40 secondes avant le temps T (bleaching). Le coefficient directeur B de la droite est calculé 40 secondes après le temps T (quenching). La soustraction du bleaching au quenching permet d'évaluer l'extinction réelle de la sonde due à la fixation du Mn^{2+} . Plus la pente est inclinée, plus il y a de sondes fixées au Mn^{2+} et plus celui-ci a traversé la membrane plasmique *via* les canaux ioniques. Le Mn^{2+} empreinte les mêmes voies d'entrée que le Ca^{2+} dans la cellule et reflète donc l'entrée cationique globale (**Figure 38**).

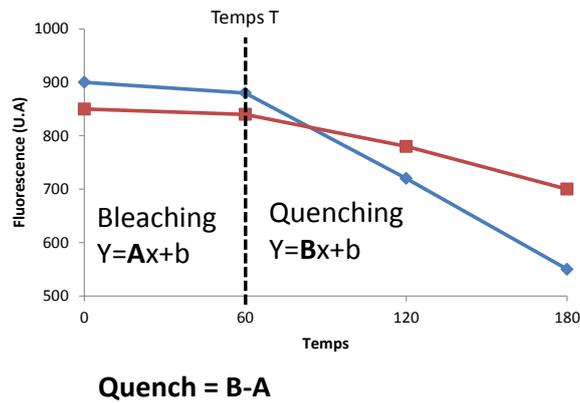


Figure 38 : Méthode d'analyse du quench Mn^{2+} .

5.5. Evaluation du Ca^{2+} cytosolique

Pour étudier les variations de la concentration calcique cytosolique, la sonde Fura2-AM est utilisée. Lorsque le Ca^{2+} se fixe sur la sonde, une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation se produisent. En effet, lorsque que le Ca^{2+} est fixé sur la sonde, il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde à 515 nm (longueur d'onde de recueil) pour la longueur d'onde d'excitation de la forme liée inférieure au point isobestique (350 nm). Cette augmentation de fluorescence due à la forme liée est corrélée à une diminution pour la longueur d'onde d'excitation de la forme libre supérieure au point isobestique (380 nm). Le ratio 350 / 380 nm est comparé entre les différentes conditions afin d'évaluer des variations de la quantité en Ca^{2+} cytosolique.

Pour réaliser cette étude, les cellules sont perfusées sous le microscope avec du milieu extracellulaire supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+} pendant 3 minutes.

5.6. Evaluation du Mg^{2+} cytosolique

Pour étudier les variations de la concentration magnésique cytosolique, la sonde MagFura-2AM. Lorsque le Mg^{2+} se fixe sur la sonde, une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation de produisent. En effet, lorsque que le Mg^{2+} est fixé, il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde à 515 nm (longueur d'onde de recueil) pour la longueur d'onde d'excitation de la forme liée inférieure au point isobestique (340 nm). Cette augmentation de fluorescence due à la forme liée est corrélée à une diminution pour la longueur d'onde d'excitation de la forme libre supérieure au point

isobéistique (370 nm). Le ratio 340 / 370 nm est comparé entre les différentes conditions afin d'évaluer la concentration en Mg^{2+} cytosolique.

Pour réaliser cette étude, les cellules sont perfusées sous le microscope avec du milieu extracellulaire supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+} pendant 3 minutes.

6. BIOCHIMIE : METHODES D'ANALYSE DES PROTEINES

6.1. Western Blot

Le Western Blot est une technique semi-quantitative qui permet d'évaluer l'expression protéique relative en comparant une condition expérimentale à une condition contrôle. L'expression de la protéine étudiée est rapportée à celle d'une protéine de référence dont l'expression est stable entre les conditions (ce qui permet de démontrer que la même quantité de protéines a été déposée dans toutes les conditions).

L'extraction protéique est effectuée à partir de cellules rincées au PBS et conservées à $-80^{\circ}C$ selon deux formats : soit en tapis cellulaire dans des boîtes soit sous forme de culot dans des tubes. Elle est réalisée sur glace pour éviter la dégradation de l'échantillon grâce à un tampon RIPA complet (**Tableau 22**) qui va dissoudre les membranes cellulaires et empêcher la dégradation des protéines :

- Après 20 minutes de contact entre les cellules et le tampon complet RIPA sur glace, grattage du tapis cellules avec une spatule et récupération du lysat (pipetage refoulement si les cellules sont sous forme de culot cellulaire).
- Centrifugation 10 minutes à $4^{\circ}C$ 15000 rpm (le contrôle positif de l'extraction est la formation d'un culot blanc d'acides nucléiques preuve de la dissolution des cellules).
- Dosage des protéines (kit BioRad). Le mélange réactionnel pour un puits (plaque 96 puits) est de 5 μ l de protéines diluées dans de l'eau au 1/5 - 25 μ l du mélange des réactifs A+S (1 mL de A pour 20 μ L de S) - 200 μ L de réactif B photosensible.
- Incubation 30 minutes sous agitation lente à l'obscurité.
- Lecture de la densité optique à 595 nm (lecteur TECAN).
- Obtention d'une concentration en μ g/ μ l en reportant la densité optique sur une gamme étalon qui relie l'intensité de densité optique en fonction de la concentration en protéines.

- Préparation des échantillons : volume de protéines correspondant à 50 µg + Tampon de charge Laemmli 5X (prendre le volume de protéines divisé par 4) et compléter avec du Laemmli 1X pour que tous les échantillons aient le même volume.
- Chauffage à 95°C pendant 10 min pour dénaturer les protéines et centrifugation rapide pour récupérer le liquide évaporé dans le bouchon.

Tableau 22 : Composition du RIPA complet.

Composant du RIPA complet (pour 1 mL)	Volume (µL)
Inhibiteur de protéase	8
EDTA 0,5 M (chélateur du Ca ²⁺ – induit le détachement cellulaire)	4
Orthovanadate (inhibiteur de phosphatase)	50

Les échantillons sont déposés dans un gel qui est constitué de deux parties. Un gel de concentration où sont situés les puits pour déposer les échantillons dont le pourcentage d'acrylamide est fixe (3 %) et un gel de séparation où les protéines dénaturées et chargées négativement par le SDS vont migrer vers l'anode selon leur poids moléculaire. Le pourcentage en acrylamide de cette partie du gel peut varier. Si l'on veut étudier des protéines de faible poids moléculaire, il faudra augmenter le pourcentage pour avoir un maillage plus serré pouvant les retenir. 3 µL de poids moléculaire (complété avec du tampon de charge Laemmli 1X) comprenant des protéines colorées de taille connues sont déposés dans un puits afin de pouvoir localiser les protéines d'intérêt dans le gel. La migration dure 1 heure à 200 volts.

Les protéines du gel sont contenues dans un maillage d'acrylamide et ne sont pas accessibles pour les anticorps. Pour les rendre accessibles, un transfert (blot) des protéines sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 heure à 100 volts est effectué.

La membrane est colorée au rouge ponceau pendant 10 minutes pour vérifier la qualité du transfert et du dosage (c'est-à-dire absence de bulles et un dépôt homogène entre les différentes conditions). La membrane est rincée à l'eau et découpée selon le poids moléculaire pour incuber les fragments de membrane correspondant aux protéines avec leurs anticorps spécifiques.

La membrane est incubée 1 heure à température ambiante sous agitation lente avec tampon de blocage (TBS Tween 0,1 % contenant un pourcentage de protéines apportées par le lait ou la BSA) pour recouvrir la membrane de nitrocellulose et limiter la fixation aspécifique des

anticorps. Le tampon choisi sera utilisé pour diluer les anticorps primaires et secondaires. Les fragments de membrane sont ensuite incubés 1 nuit sous agitation lente à 4°C avec les anticorps primaires. Après 3 lavages de 10 minutes sous agitation au TBS Tween 0,1 %, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante sous agitation lente avec les anticorps secondaires ciblant l'espèce chez laquelle a été produite l'anticorps primaire (**Tableau 23**). La membrane est ensuite de nouveau lavée 3 fois 10 minutes au TBS Tween 0,1 % et les bandes sont révélées à l'aide du kit ECL et du système d'acquisition d'image (Chemidoc).

Tableau 23 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.

Protéine	Dilution de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps secondaire
Protéine étudiées (poids moléculaire- fournisseur – référence)		
TRPM7 (213) Ab109438 Abcam	1/1000 BSA 5%	1/3000 BSA 5% Anti-rabbit
Hsp90 total (90) Ab13492 Abcam	Blocage lait 5% 1/2000 Incubation lait 1%	1/2000 Lait 1% Anti-mouse
Hsp90 alpha (90) Ab79849 Abcam	Blocage lait 5% 1/2000 Incubation lait 1%	1/2000 Lait 1% Anti-mouse
Phospho sérine (clone 4a4) 05-100 Millipore	1/2000 BSA 5%	1/4000 BSA 5% Anti-mouse
N-cadhérine (125) Ab18203 Abcam	1/1000 BSA2%	1/5000 - BSA 2% Anti-rabbit
E-cadhérine (110) Ab76055 Abcam	1/1000 Lait 5 %	1/5000 Lait 5% Anti-mouse
Vimentine (SP20) (54) MA5-16409 ThermoFischer	1/250 Lait 5 %	1/10 000 Lait 5% Anti-rabbit
Gène de référence		
GAPDH (37) Ab8245 Abcam	1/4000 BSA 5%	1/5000 BSA 5% Anti-mouse
Tubuline (45) SAB4500087 Sigma	1/7000 BSA 5%	1/5000 BSA 5% Anti-rabbit

6.2. Zymographie

Cette technique dérivée du Western Blot permet d'étudier l'expression relative de protéine à activité protéolytique : les métalloprotéases matricielles (plus précisément les gélatinases MMP-2 et MMP-9). Les échantillons utilisés sont des milieux de cultures sans sérum de veau foetal dans lesquels les cellules ont sécrétées des MMPs. 20 µL d'échantillon (à ajuster entre les conditions en fonction du test MTT qui valide si le nombre de cellules est le même entre les conditions) sont mélangés avec 5 µL de tampon de charge Laemmli 5X. 10 µL de milieu de culture de cellules HT10-80 sécrétant des MMPs (contrôle positif) sont également déposés. Le gel est en deux parties (comme en Western Blot). Le gel de concentration contient 4 % d'acrylamide et le gel de séparation 10 % acrylamide et 0,1 % SDS. La particularité du gel de séparation est qu'il contient 0,1 % de gélatine qui va permettre de détecter l'emplacement de la MMP par sa dégradation. La migration dure 1 heure et 30 minutes à 100 volts. Les gels sont ensuite rincés 30 minutes à température ambiante dans deux bains de Triton 100X 2,5 % sous agitation pour enlever le SDS et réactiver les gélatinases. Les gels sont ensuite incubés 24 heures à 37°C dans un tampon optimal pour l'activité des MMPs. Les gels sont colorés 30 minutes dans une solution de coloration (Bleu de Coomassie (10 %) dilué dans 0,1 % d'acide acétique et 20 % de méthanol). Enfin, les gels sont décolorés dans une solution contenant 10 % d'acide acétique et 20 % de méthanol. L'emplacement de la gélatinase est représenté par une tache blanche sur un fond bleu.

Grâce à cette technique, il est possible également d'évaluer l'expression des inhibiteurs des MMPs, les TIMPs en zymographie inverse. La pro-MMP-2 inactive est incorporée dans le gel de séparation. Les zones qui ne seront pas digérées (bande bleue sur fond blanc) représentent l'expression des TIMPs qui empêche la dégradation de la gélatine par les MMPs.

La zymographie avec plasminogène permet d'évaluer l'expression des activateurs du plasminogène uPA et tPA. Le plasminogène est intégré dans le gel de séparation et le tampon d'incubation est spécifique de ces activateurs. Les zones digérées (bande blanche sur fond bleu) représentant l'expression des activateurs du plasminogène qui ont permis sa conversion en plasmine et l'activité gélatinolytique des MMPs. Le gel est photographié et analysé grâce au logiciel Bio1D.

6.3. Immunoprécipitation

Cette technique permet d'étudier les interactions entre les protéines. Elle utilise un anticorps primaire immunoprécipitant qui sera spécifique d'une protéine d'intérêt dont on suppose qu'elle appartient à un complexe protéique. Cet anticorps a un double rôle à la fois capable de capter par ses extrémités spécifiques la protéine d'intérêt et ses partenaires et de s'accrocher à des billes magnétiques par le fragment cristallisable afin de récupérer les protéines accrochées à cet anticorps.

- Lavages des billes (100 µL par condition) 2 fois au RIPA complet.
- Pré-clearing : Incubation d'1 mg de protéine (à compléter avec du RIPA complet pour attendre le volume de 300 µL) à 50 µL de billes pendant 2 heures à 4°C sous agitation / Retrait des billes (qui ont fixé aspécifiquement les protéines en absence d'anticorps primaire immunoprécipitant)
- Incubation des protéines avec l'anticorps pendant 1 nuit à 4°C sur la roue (formation des complexes protéines-anticorps) (**Tableau 24**).
- Incubation des protéines avec les billes pendant 1 heure à 4°C sur la roue (formation de complexe billes – anticorps – protéines).
- Lavage des billes 3 fois au PBS.
- Elution acide : Ajout de 30 µL de glycine 0,2 M pH=2,5 sur les billes pendant 2 minutes à température ambiante (décrochage des complexe anticorps-protéines fixées aux billes).
- Neutralisation : Ajout de 2,5 µL de tampon Tris pH=8,5 1M.
- Ajout de tampon de charge Laemmli 5X à l'échantillon ($32,5 / 4 = 8,1$ µL de tampon de charge).
- Chauffage 10 min à 95°C (dissociation de l'anticorps et des protéines immunoprécipitées).
- Conservation des échantillons à -20°C si besoin.
- Retrait des billes de l'échantillon et dépôt sur gel de Western Blot.

Tableau 24 : Liste des anticorps et des billes magnétiques utilisés en immunoprécipitation.

Protéine immunoprécipitée (référence – fournisseur de l'anticorps)	Volume (dans 300 µL de protéines)	Billes magnétiques utilisées
TRPM7 (Ab109438 - Abcam)	5	G
Hsp90 (Ab13492– Abcam)	4	G
Hsp90alpha (Ab79849 - Abcam)	4	G
Anti HA C29F4 (TRPM7 ZF) 3724-Cell signalling	6	G

6.4. Immunofluorescence

L'immunofluorescence utilise des anticorps secondaires qui vont être couplés à des fluorochromes. Ces molécules vont absorber une longueur d'onde spécifique de la lumière (longueur d'onde d'excitation) et vont émettre une fluorescence à une longueur d'onde précise (longueur d'onde d'émission) pour revenir à leur état basal. La fluorescence est donc détectée à l'endroit où se situe l'anticorps secondaire et donc l'anticorps primaire couplé à la protéine d'intérêt. Cette technique, couplée à la microscopie confocale, permet de localiser les protéines dans les cellules.

Les expériences utilisent des cellulesensemencées sur des petites lamelles de verre (diamètre 18 mm) préalablement désinfectées à l'alcool 70° et au PBS. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) (4 %) pendant 15 minutes à température ambiante et rincées deux fois au PBS pendant 10 minutes pour enlever l'excédent de PFA. Les cellules fixées sont perméabilisées au PBS / Triton 0,5 % pendant 10 minutes à température ambiante afin que les anticorps primaires puissent pénétrer dans la cellule. Cette étape est essentielle dans notre cas car tous les épitopes des protéines sont cytosoliques.

Le protocole reprend ensuite les étapes d'un Western Blot classique : blocage des sites non spécifiques avec une solution de BSA 5 % pendant 30 minutes à température ambiante, incubation avec les anticorps primaires 1 nuit à 4°C, incubation avec les anticorps secondaires (à l'obscurité) pendant 45 min à 4°C (**Tableau 25**). Les noyaux des cellules sont ensuite marqués au DAPI (30 secondes de contact de la solution de DAPI avec les échantillons) et le montage de la lamelle sur une lame porte-objet est effectué à l'obscurité.

Tableau 25 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.

Protéine marquées (référence et fournisseur de l'anticorps)	Dilution de l'anticorps	Dilution de l'anticorps secondaire
TRPM7 (Ab109438 - Abcam)	1/100	1/100 - Anti-rabbit DyeLight 550
Hsp90 alpha (Ab79849-Abcam)	1/50	1/100 - Anti-mouse Alexa-Fluor 488
TRPM7 ZF-HA (C29F4 3724 -Cell signalling)	1/1000	1/100 - Anti-rabbit DyeLight 550

6.5. Proximity Ligation Assay

La technique de proximity ligation assay (PLA) est une technique qui couple les techniques d'immunofluorescence et de PCR (**Figure 39**). La PLA est une technique novatrice qui permet de voir des interactions entre deux protéines très proches (< 40 nm) dans les cellules. Dans nos expériences, nous allons étudier l'interaction entre la protéine chaperonne Hsp90 α et le canal TRPM7 sur des lignées cellulaires cancéreuses et non-cancéreuses. Les anticorps secondaires au lieu d'être liés à un système de détection fluorescent, sont couplés à un brin d'ADN. Si les deux protéines sont assez proches, une molécule d'ADN circulaire va se former. La formation de cette molécule est possible grâce à l'ajout de brins d'ADN complémentaires qui vont se fixer aux brins couplés aux anticorps et d'une ligase va relier les brins d'ADN s'ils sont suffisamment proches. Si ce n'est pas le cas, la ligase ne pourra pas relier les deux brins pour former l'ADN circulaire. Le système de détection consiste grâce à une polymérase à effectuer une « amplification en cercle » afin de synthétiser de l'ADN à partir de l'ADN circulaire. La détection s'effectue grâce à des oligonucléotides fluorescents qui vont se fixer à cet ADN nouvellement synthétisé. Cette fixation va générer du signal à l'endroit où les protéines interagissent physiquement et directement. Le nombre de points de colocalisation est ensuite compté par photographies et divisé par le nombre de cellules (dont le noyau est coloré en bleu par le DAPI).

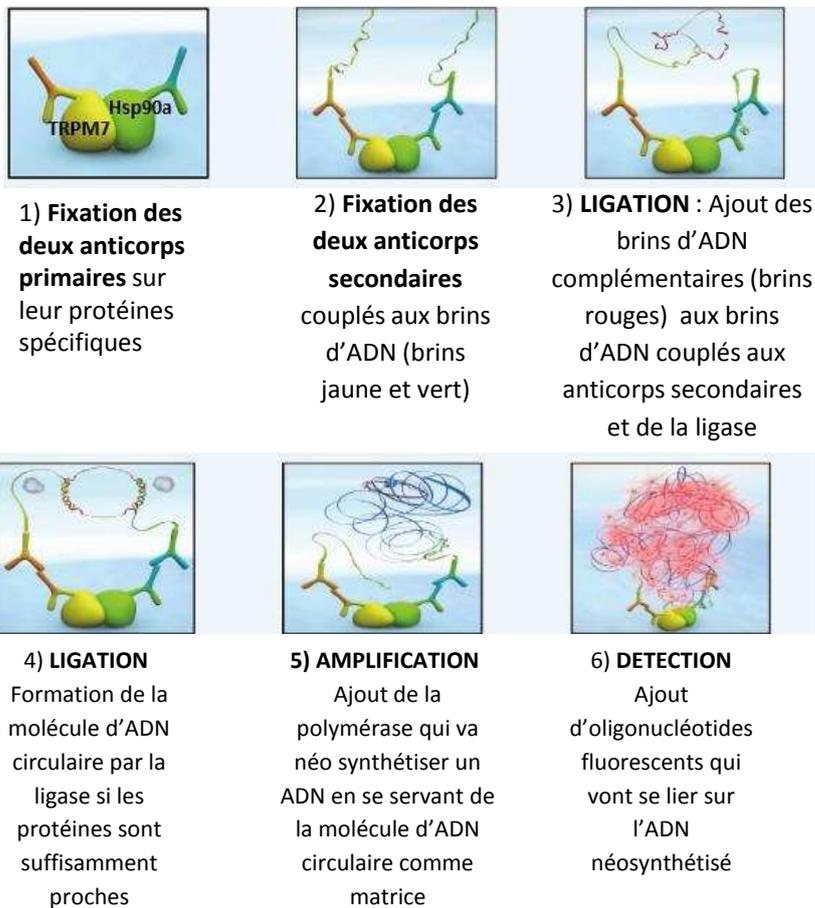


Figure 39 : Principe de la PLA.

Les premières étapes du protocole de PLA sont les mêmes que dans le protocole d'immunofluorescence jusqu'au lavage après l'incubation avec les anticorps primaires. Les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37°C en chambre humide avec les deux anticorps secondaires du kit (ou un seul pour les contrôles négatifs 2 et 3) appelés PLA probes dilués au 1/5^{ème} dans le tampon du kit selon le **tableau 26**.

Tableau 26 : Composition de la solution d'incubation des anticorps secondaires.

Réaction	Composition
PLA / Contrôle négatif 1 (sans anticorps primaire)	8 µL PLA probe MINUS anti souris 8 µL PLA probe PLUS anti souris 24 µL d' <i>Antibody Diluent</i> [®]
Contrôle négatif 2	8 µL PLA probe MINUS anti souris 32 µL d' <i>Antibody Diluent</i> [®]
Contrôle négatif 3	8 µL PLA probe PLUS anti rabbit 32 µL d' <i>Antibody Diluent</i> [®]

Le contrôle négatif 1 permet de savoir si la détection du signal est bien une conséquence de la présence des deux anticorps primaires situés à proximité. Les contrôles négatifs 2 et 3 permettent de savoir si la détection du signal est bien due à la proximité des deux anticorps secondaires.

Ensuite, nous procédons à l'étape de ligation après avoir rincé les puits 2 fois avec 500 µL de solution de lavage A fournie dans le kit pendant 5 minutes sous agitation douce. Chaque puits contient 2 µL de ligase et 78 µL de tampon de ligase (préalablement dilué au 1/5^{ième} dans de l'eau ultrapure). L'incubation dure 30 minutes à 37 °C en chambre humide.

L'étape suivante est l'amplification après avoir rincé les puits 2 fois avec 500 µL de solution de lavage A pendant 2 minutes sous agitation douce. Cette réaction s'effectue à l'obscurité car les réactifs sont sensibles à la lumière. Chaque puit contient 1 µL de polymérase et 79 µL de tampon de polymérase (préalablement dilué au 1/5^{ième} dans de l'eau ultrapure). L'incubation dure 100 minutes à 37°C en chambre humide.

La prochaine étape est une succession de lavages avec divers tampons pour enlever les excès de réactifs et le montage de la lame. Après avoir éliminé la solution d'amplification, à l'obscurité :

- Laver deux fois les puits avec le tampon de lavage B pendant 10 minutes.
- Laver une fois les puits avec le tampon de lavage B (dilué au 1/100^{ième}) pendant 1 minute.
- Enlever l'excédent de tampon pour ne pas diluer le milieu de montage, démonter le système de puits de la lame, gratter minutieusement la colle et déposer sur la lame quelques gouttes de milieu de montage fourni dans le kit (contenant du DAPI).
- Monter la lamelle sur la lame porte-objet en chassant au maximum les bulles d'air en appuyant doucement sur la lamelle.
- Attendre 15 minutes à l'obscurité.
- Immobiliser la lamelle sur la lame en recouvrant les coins d'une pointe de vernis.
- Laisser sécher le vernis avant d'observer la lame au microscope à fluorescence.
- Conserver les lames à -20°C à l'obscurité.

6.6. Utilisation du microscope à fluorescence

Après avoir allumé le microscope et les différents modules, l'utilisation se fait grâce à l'écran de contrôle du microscope. L'écran de contrôle comprend trois onglets :

- « objectives » qui permet de choisir l'objectif du microscope (x20 – x40 – x63 à utiliser avec l'huile à immersion).
- « Light path » qui permet de choisir, grâce à un jeu de miroir, la trajectoire de la lumière qui doit être de 50 % vers l'utilisateur et 50 % vers l'ordinateur pour pouvoir observer à la fois les cellules sous le microscope et de faire l'acquisition avec le logiciel ActioVision.
- « Reflector » qui permet de choisir le filtre utilisé adapté au fluorochrome. Le microscope comprend 3 filtres pour détecter la fluorescence bleue émise par les noyaux marqués au DAPI et la fluorescence mise par les deux anticorps secondaires utilisés : l'Alexa fluor est excité à 488 nm émet à 520 nm (vert) et le DyeLight est excité à 550 nm et émet à 670 nm (rouge).

7. ANALYSES STATISTIQUES

Chaque expérience a été effectuée au moins 3 fois sur 3 passages différents. Les résultats sont exprimés grâce à la moyenne des données et l'erreur standard à la moyenne (SEM) représente la variabilité. Le logiciel de test statistique utilisé est Sigma Stats 3.0.

Pour la comparaison des moyennes de deux groupes, après vérification de la distribution normale des échantillons, par le test de Kolmogorov-Smirnoff, le test de t paramétrique (test de Student) est utilisé. En cas de distribution non normale des valeurs, le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé. Le seuil de significativité des valeurs est fixé à 5 % ($p < 0,05$). Les valeurs de $p < 0,05$, $< 0,01$ et $< 0,001$ sont indiquées par *, **, *** respectivement.

Pour la comparaison de plus de deux moyennes, le test d'analyse de variance à un ou deux paramètres est utilisé (ANOVA) suivi des tests post-hoc ou Holm-Sidak. Les différences obtenues ont été considérées comme significative lorsque $p < 0,05$ indiqué par *.

RESULTATS

1. LE CANAL TRPM7 REGULE L'INVASION DES CELLULES
D'ADENOCARCINOME CANALAIRE VIA LA VOIE IMPLIQUANT HSP90
ALPHA / UPA / MMP-2

1.1. Résumé

L'ACP est le 4ème cancer le plus mortel avec un taux de survie de 5 % à 5 ans et la survie médiane est d'environ 6 mois. Ce pronostic très défavorable est dû à une détection tardive à cause de l'absence de biomarqueurs et de symptômes précoces. Les traitements chimio et radiothérapeutiques couplés à la chirurgie permettent d'augmenter le taux de survie de 5 à 20 % seulement car les tumeurs sont très résistantes et très métastatiques (Koorstra et al., 2008). Pour toutes ces raisons, l'ACP est un problème de santé publique majeur et il y a un besoin urgent de mieux comprendre sa progression et plus particulièrement les mécanismes impliqués dans l'apparition des métastases, qui sont la principale cause de mortalité dans le cancer et qui apparaissent précocement chez les patients atteints d'ACP.

La formation des métastases s'effectue grâce à une succession de mécanismes, appelée cascade métastatique, qui vont permettre aux cellules cancéreuses de sortir de la tumeur primaire et d'envahir de manière locale et distante leur environnement. L'invasion cellulaire est un mécanisme précoce de la cascade métastatique (Mina et al., 2011). Les données bibliographiques montrent un rôle des canaux ioniques et plus particulièrement TRPM7 dans la migration cellulaire. La lignée BxPC-3 est un modèle cellulaire cancéreux pancréatique non métastatique ne présentant pas la mutation Kras. Dans ce modèle, TRPM7 régule la migration Mg²⁺ dépendante. De plus, TRPM7 est surexprimé dans les biopsies de tumeur en corrélation avec le grade et l'apparition des métastases et en corrélation inverse avec la survie des patients (Rybarczyk et al., 2012).

L'objectif de notre étude était de démontrer le rôle de TRPM7 dans les mécanismes d'invasion cellulaire dans l'ACP. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires humaines invasives portant la mutation Kras, PANC-1 et MIA PaCa-2. Ces cellules sont dérivées d'ACP et correspondent à un cancer de grade 3. L'extinction de TRPM7 est réalisée de manière stable ou transitoire grâce à l'utilisation de shRNA et siRNA dans les cellules PANC-1 et MIA PaCa-2 respectivement.

Nous avons démontré que TRPM7 est bien exprimé dans les deux lignées au niveau des transcrits par RT-PCR qualitative et protéique par Western Blot. TRPM7 étant capable de former des hétérotétramères avec son homologue TRPM6, nous avons également évalué son expression par RT-PCR. Son expression, dépendante de la lignée, est seulement retrouvée dans les cellules MIA PaCa-2.

L'activité canalaire, mesurée par la technique de patch clamp, montre un courant MIC sensible au Mg^{2+} cytosolique dans les cellules PANC-1. L'utilisation d'un shRNA et d'un siRNA dirigés contre TRPM7 diminuent les transcrits et l'amplitude du courant MIC. TRPM7 est donc exprimé et localisé à la membrane dans les deux lignées.

L'extinction de TRPM7 diminue l'entrée cationique constitutive mesurée par la technique de quench Mn^{2+} . TRPM7 est un canal cationique non sélectif perméable au Ca^{2+} et au Mg^{2+} que nous avons étudiés par les techniques d'imagerie cellulaire et l'utilisation de sondes Fura-2AM et Mag Fura-2AM. L'extinction de TRPM7 par shRNA ne modifie pas la concentration calcique cytosolique dans les cellules PANC-1 contrairement aux cellules MIA PaCa-2. La régulation de l'homéostasie calcique est dépendante du modèle cellulaire utilisé. L'extinction de TRPM7 dans les deux lignées va diminuer la concentration magnésique cytoplasmique. TRPM7 est constitutivement actif et régule l'homéostasie magnésique dans les cellules d'ACP.

L'implication de TRPM7 dans l'invasion cellulaire a également été évaluée en utilisant des chambres de Boyden modifiées recouvertes d'éléments matriciels (Matrigel). L'extinction de TRPM7 dans les deux modèles diminue fortement l'invasion cellulaire basale non stimulée par des facteurs de croissance sans affecter la prolifération cellulaire. L'invasion cellulaire est possible grâce à la sécrétion par les cellules de protéases, les MMPs, qui vont dégrader la membrane basale et la MEC et permettent aux cellules d'envahir les tissus. TRPM7 régule la sécrétion de la MMP-2, évaluée par zymographie. De plus, on observe une baisse de la sécrétion d'uPA. Cette protéine, en se fixant à son récepteur uPAR, va permettre l'activation de la plasmine qui va elle-même activer les MMPs par clivage protéolytique. De plus, la sécrétion d'Hsp90 α , détectée par Western Blot, est diminuée également. Cette protéine chaperonne est impliquée, grâce à des interactions avec des protéines clientes tel que uPA et MMP-2, dans les mécanismes d'invasion cellulaire. TRPM7 régule donc l'invasion basale par une voie impliquant Hsp90 α , l'uPA et la MMP-2 dans les cellules d'ACP.

De plus, dans les cellules MIA PaCa-2 déficiente pour TRPM7, l'entrée de Mg^{2+} suite à une augmentation du Mg^{2+} extracellulaire (de 1 à 10 mM) n'est plus observable comparées aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle. Cette augmentation du Mg^{2+} extracellulaire augmente l'invasion et la sécrétion de la MMP-2. La diminution d'invasion suite à l'extinction de TRPM7 n'est pas restaurée par une supplémentation en Mg^{2+} . Ces résultats démontrent que l'influx magnésique par TRPM7 dans les cellules d'ACP est corrélé avec l'invasion et la sécrétion de la MMP-2.

Au laboratoire, il a été démontré que TRPM7 était surexprimé dans les biopsies d'ACP en corrélation avec les paramètres cliniques. TRPM7 est également détecté dans les métastases des ganglions lymphatiques. De plus, si l'expression de TRPM7 est élevée dans les cellules ayant envahis les ganglions alors elle l'est également dans la tumeur primaire.

Cette étude décrit, dans l'ACP, un lien entre TRPM7 et des acteurs connus de l'invasion cellulaire la MMP-2, l'uPA. Hsp90 α dont la sécrétion est également régulée par TRPM7, conduirait à la stabilisation et l'activation de MMP-2 et uPA, permettant la dégradation de la lame basale et de la matrice qui est prérequis pour l'invasion cellulaire. De plus, TRPM7 joue un rôle dans l'invasion en régulant l'homéostasie magnésique. Son expression dans la tumeur primaire est corrélée à celle dans les métastases ayant envahis les ganglions lymphatiques, confirmant que ce canal est un biomarqueur prometteur et une cible thérapeutique potentiel dans l'ACP.

**The Transient Receptor Potential Melastatin 7
Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion
through the Hsp90 α /uPA/MMP2 pathway**

Pierre Rybarczyk, Alison Vanlaeys, Bertrand Brassart, Isabelle Dhennin-Duthille, Denis Chatelain, Henri Sevestre, Halima Ouadid-Ahidouch and Mathieu Gautier

Received : September 30, 2016 Accepted : January 13, 2017 Published : April 19, 2017



The Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion through the Hsp90α/uPA/MMP2 pathway¹



Pierre Rybarczyk^{*,†,2}, Alison Vanlaeys^{*,†,2},
Bertrand Brassart^{†,‡,2}, Isabelle Dhennin-Duthille^{*,†},
Denis Chatelain[§], Henri Sevestre^{*,†,§},
Halima Ouadid-Ahidouch^{*,†,2} and Mathieu Gautier^{*,†,2}

*Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire-EA4667, UFR Sciences, Université de Picardie Jules Verne, F-80039 Amiens, France; [†]SFR CAP-Santé (FED 4231); [‡]UMR CNRS 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne Ardenne (URCA), F-51095 Reims, France; [§]Service d'anatomie pathologique, CHU d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne, F-80000 Amiens, France, France

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive malignancy with a very poor prognosis. There is an urgent need to better understand the molecular mechanisms that regulate PDAC cell aggressiveness. The transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) is a nonselective cationic channel that mainly conducts Ca²⁺ and Mg²⁺. TRPM7 is overexpressed in numerous malignancies including PDAC. In the present study, we used the PANC-1 and MIA PaCa-2 cell lines to specifically assess the role of TRPM7 in cell invasion and matrix metalloproteinase secretion. We show that TRPM7 regulates Mg²⁺ homeostasis and constitutive cation entry in both PDAC cell lines. Moreover, cell invasion is strongly reduced by TRPM7 silencing without affecting the cell viability. Conditioned media were further studied, by gel zymography, to detect matrix metalloproteinase (MMP) secretion in PDAC cells. Our results show that MMP-2, urokinase plasminogen activator (uPA), and heat-shock protein 90α (Hsp90α) secretions are significantly decreased in TRPM7-deficient PDAC cells. Moreover, TRPM7 expression in human PDAC lymph node metastasis is correlated to the channel expression in primary tumor. Taken together, our results show that TRPM7 is involved in PDAC cell invasion through regulation of Hsp90α/uPA/MMP-2 proteolytic axis, confirming that this channel could be a promising biomarker and possibly a target for PDAC metastasis therapy.

Neoplasia (2017) 19, 288–300

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents more than 80% of all pancreatic cancers. PDAC is the fourth most common cause of global cancer-related death [1]. With 5-year survival rate of less than 5% and a median survival of 6 months after diagnosis, PDAC has the poorest prognosis of all solid cancers. This high mortality is due to the absence of symptoms at early stages without any routine screening test for PDAC. Moreover, there is no specific treatment for PDAC because surgery associated or not with chemo- and radiotherapies only increases 5-year survival to 20%. The majority of patients already have metastases dissemination which is associated with an extremely poor prognosis [2]. Thus, there is an urgent need to find new targets against PDAC metastasis formation

Address all correspondence to: Mathieu Gautier, University of Picardie Jules Verne, F-80039 Amiens, France.

E-mail: mathieu.gautier@u-picardie.fr

¹P. R. was a recipient of funding from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A. V. is a recipient of funding from the Conseil Régional de Picardie. This work was supported by FEDER, la Ligue Contre le Cancer (Septentrion), and la SFR CAP-Santé (FED 4231).

² Both authors contributed equally to this work.

Received 30 September 2016; Revised 5 January 2017; Accepted 13 January 2017

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Neoplasia Press, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1476-5586

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.01.004>

and dissemination. Metastasis is based on a complex mechanism called the metastatic cascade. Cell invasion including basal membrane degradation and spreading in the surrounding stroma is an important step of the metastatic cascade. Among the proteins that regulate the metastasis cascade, transmembrane ion channels and transporters (called transportome) provide signaling pathways that drive cell invasion [3,4].

Ion channels are integral membrane proteins that are involved in many physiological and pathological processes. There is growing evidence that cancer cell hallmarks are strongly regulated by ion channels including K^+ [5–7], Ca^{2+} [8–10], and Na^+ channels [11,12]. In particular, several channels including transient receptor potential (TRP) channels are implicated in molecular mechanisms of the metastatic cascade [4]. TRPs are nonselective cation channels that are mainly permeable to Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , and K^+ . Among TRP channels, the transient receptor potential melastatin related 7 (TRPM7) channel is a Ca^{2+}/Mg^{2+} channel fused with a functional kinase domain that belongs to the α -kinase family [13,14]. We and others showed that TRPM7 is involved in migration and/or invasion of epidermal cancer cells including neuroblastoma [15,16], glioblastoma [17], breast cancer [18,19], nasopharynx cancer [20,21], lung cancer [22], prostate cancer [23], and PDAC [24,25]. Importantly, TRPM7 is required for breast cancer metastasis formation in mouse xenograft, and high channel expression is an independent marker of poor outcome in breast cancer patients [26]. Moreover, TRPM7 expression contributes to neuroblastoma progression and metastatic properties by maintaining progenitor-like features [27]. In PDAC, we have shown previously that TRPM7 is overexpressed in human cancer tissues when compared to the healthy ones [24]. Moreover, TRPM7 expression is associated with cancer progression and poor outcome in PDAC. Nevertheless, the molecular mechanisms that regulate PDAC cell invasion are poorly understood. In the present study, we aim to determine how TRPM7 regulates PDAC cell invasiveness.

Results

TRPM7 Expression in PDAC Cell Lines

First, we determined TRPM7 expression in PANC-1 and MIA PaCa-2 PDAC cell lines by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot (Figure 1). TRPM7 mRNAs (Figure 1A) and proteins (Figure 1B) are detected in both PDAC cell lines. As TRPM7 is able to form heterotetramers with its close homologue TRPM6, we also assessed TRPM6 expression. TRPM6 mRNA is not detected in the PANC-1 cell line but is found in the MIA PaCa-2 cell line, indicating that TRPM7 is expressed in both

PANC-1 and MIA PaCa-2 PDAC cell lines in contrast to the TRPM6 expression which is cell line dependent.

When expressed at the plasma membrane, TRPM7 channels are responsible for the magnesium-inhibited cation (MIC) currents [13,14]. Thus, whole-cell patch clamp was used to study the TRPM7 expression at the plasma membrane and to further characterize MIC currents in PANC-1 cells (Figure 2). MIC currents are recorded after dialyzing intracellular media by an intrapipette solution containing EGTA to chelate intracellular Mg^{2+} . MIC currents develop during the cytosol dialysis and reach a steady state in ~15 minutes (Figure 2A, averaged trace of nine cells). These currents have a typical shape of TRPM7-like currents with a small inward component (-2.6 ± 0.9 pA.pF $^{-1}$ at -100 mV), a reversal potential close to 0 mV, and a strong outward rectification (19.5 ± 3.6 pA.pF $^{-1}$ at $+100$ mV; Figure 2B, averaged trace of nine cells). Intracellular Mg^{2+} inhibits MIC currents in a concentration-dependent manner. The free Mg^{2+} concentration in the patch clamp pipette is calculated using the WEBMAX software. MIC currents are inhibited by free $[Mg^{2+}]_i$ of 210 μ M, 400 μ M, and 680 μ M (Figure 2C). Although inward currents recorded at -100 mV are not significantly reduced by Mg^{2+} [-2.6 ± 0.9 pA.pF $^{-1}$ for control ($n=9$), -3.7 ± 0.7 pA.pF $^{-1}$ for 210 μ M ($n=7$), -1.6 ± 0.4 pA.pF $^{-1}$ for 400 μ M ($n=7$), and -0.7 ± 0.6 pA.pF $^{-1}$ for 680 μ M ($n=6$); $P=0.062$], a strong decrease of outward rectification is induced by intracellular Mg^{2+} (Figure 2, C and D). Indeed, MIC currents recorded at $+100$ mV are reduced from 19.5 ± 3.6 pA.pF $^{-1}$ for control ($n=9$) to 13.2 ± 1.1 pA.pF $^{-1}$ for 210 μ M ($n=7$) and 8.9 ± 1.5 pA.pF $^{-1}$ for 400 μ M ($n=7$) and fully abolished for 680 μ M (-0.7 ± 0.6 pA.pF $^{-1}$; $n=6$; $P<0.001$). Moreover, TRPM7 is also sensitive to MgATP within a range of free $[Mg^{2+}]_i$ that produces only moderate inhibitory effects on currents [13]. Here, we show that the addition of 1 mM ATP to 210 μ M free $[Mg^{2+}]_i$ induced a strong inhibition of MIC currents (3.2 ± 1.8 pA.pF $^{-1}$ at $+100$ mV; $n=3$; $P<0.05$ when compared to the control 0 free $[Mg^{2+}]_i$ and to the 210 μ M free $[Mg^{2+}]_i$ alone), suggesting that MIC currents recorded in PANC-1 cells are due to TRPM7 activity (Figure 2, E and F).

Role of TRPM7 in MIC Current recorded in PDAC Cells

To date, specific pharmacological TRPM7 blockers are not available. Thus, both transient TRPM7 silencing and stable TRPM7 silencing by small interfering RNA (siRNA) or short hairpin RNA (shRNA) are used to confirm that TRPM7 is responsible for the MIC currents recorded at the MIA PaCa-2 and PANC-1 plasma membrane. We previously validated siRNA targeting TRPM7 in human breast and pancreatic cancer cells [19,24,28]. TRPM7

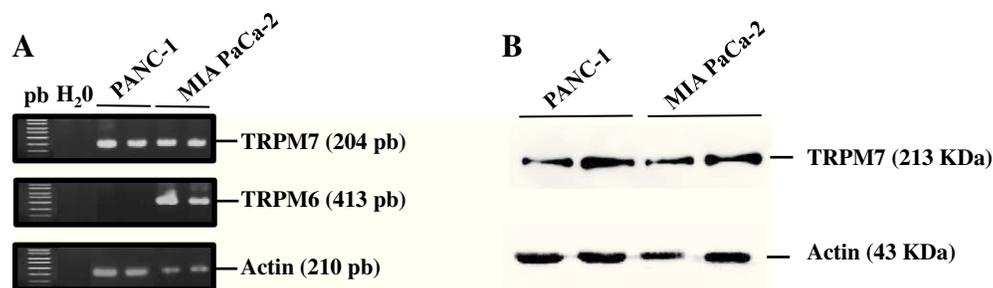


Figure 1. TRPM7 and TRPM6 channel expression in human PDAC cell lines. (A) Both TRPM7 and TRPM6 mRNAs are detected in the MIA PaCa-2 human PDAC cell line by RT-PCR in two different passages, whereas PANC-1 cells express only TRPM7 channel. Water is used as negative control. (B) Western blot indicating that TRPM7 protein is expressed in both PANC-1 and MIA PaCa-2 cell lines.

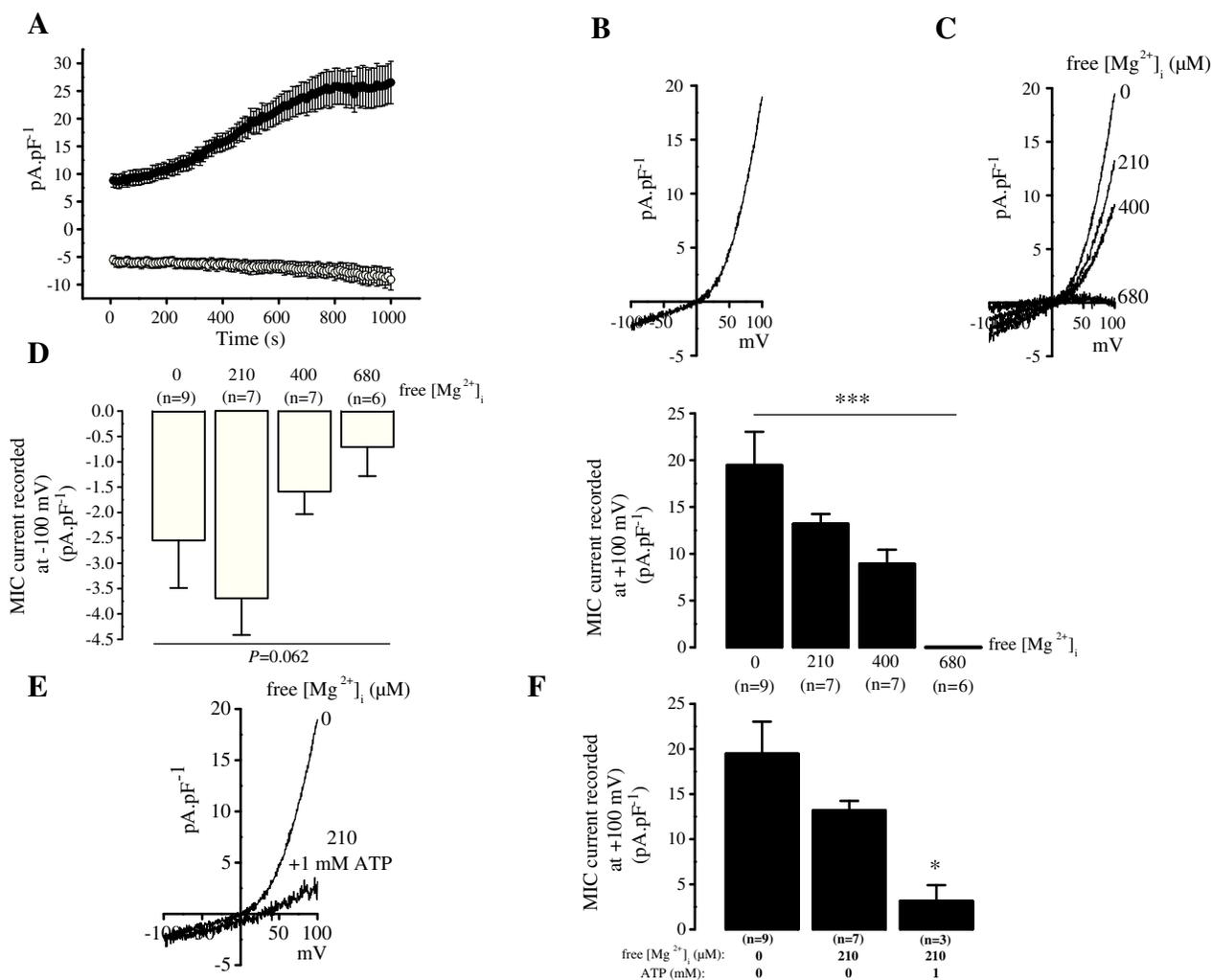


Figure 2. Electrophysiological properties of MIC currents in PANC-1 cells. (A) Membrane currents are recorded after 350-millisecond ramp depolarization from -100 mV to $+100$ mV at 0.1 Hz under whole-cell patch clamp. MIC currents are activated by dialyzing the intracellular media by an intrapipette solution without Mg^{2+} . Both outward currents recorded at $+100$ mV (black circles; $n=9$ cells) and inward currents recorded at -100 mV (white circles; $n=9$ cells) increase following intracellular Mg^{2+} depletion. (B) Endogenous MIC currents have an inward component, a strong outward rectification, and a membrane reversal potential close to 0 mV (averaged trace of nine recordings). (C) Dialyzing of intracellular media with intrapipette solutions containing Mg^{2+} decreases MIC currents in a dose-dependent manner. (D) MIC currents recorded at -100 mV (white histograms) and at $+100$ mV (black histograms) are inhibited by increasing intracellular free Mg^{2+} from 0 ($n=9$ cells) to 210 ($n=7$ cells), 400 ($n=7$ cells), and 680 μ M ($n=6$ cells). (E) Addition of 1 mM ATP in the intrapipette solution potentiates the inhibitory effect of Mg^{2+} on MIC currents ($n=3$ cells). (F) Interacting effects of intracellular free Mg^{2+} and ATP on outward MIC currents recorded at $+100$ mV. MIC currents are inhibited by 1 mM ATP complexed with 210 μ M free Mg^{2+} ($n=3$ cells) when compared to 210 μ M free Mg^{2+} ($n=7$ cells) and to 0 free Mg^{2+} ($n=9$ cells).

silencing with shRNA or siRNA induces a TRPM7 mRNA decrease of $62\pm 3\%$ (Figure 3A; $N=3$; $P<0.001$) and $67\pm 15\%$ (Figure 3D; $N=3$; $P<0.05$) in PANC-1 and MIA PaCa-2 cells, respectively, when normalized to the control condition. As shown in Figure 3, MIC currents recorded at $+100$ mV are reduced from 29.6 ± 4.6 pA.pF⁻¹ ($n=6$) to 5.0 ± 2.4 pA.pF⁻¹ ($n=4$; $P<0.001$; Figure 3, B and C) in PANC-1 cells stably transfected by shRNA and from 15.7 ± 2.6 pA.pF⁻¹ ($n=12$) to 1.8 ± 1.1 pA.pF⁻¹ ($n=6$; $P<0.01$; Figure 3, E–F) in MIA PaCa-2 cells transfected by siRNA.

Role of TRPM7 in Constitutive Cation Entry and Basal Ca²⁺ and Mg²⁺ Homeostasis

TRPM7 channels are permeable for Ca²⁺ [29] and Mg²⁺ [30]. Constitutive cation entry is measured by Mn²⁺ quenching of Fura-2

fluorescence technique (Figure 4). TRPM7 silencing significantly reduces Mn²⁺ quenching slope in both PANC-1 (from -1.73 ± 0.11 to -1.05 ± 0.07 ; $n=166$ and 216 , respectively; $P<0.001$; Figure 4A) and MIA PaCa-2 cell lines (from -2.16 ± 0.13 to 0.77 ± 0.1 ; $n=171$ and $n=112$, respectively; $P<0.001$; Figure 4B). These experiments indicate that TRPM7 channels constitutively conduct divalent cations entry in PDAC cells. Furthermore, we measure both basal Ca²⁺ and Mg²⁺ intracellular fluorescence using Fura-2 and MagFura-2 probes, respectively, to determine whether TRPM7 channels regulate Ca²⁺ and Mg²⁺ homeostasis in PANC-1 and MIA PaCa-2 cells.

Stable TRPM7 silencing failed to affect Ca²⁺ basal fluorescence (1.05 ± 0.03 ; $n=80$) when compared to sh-Control (1.00 ± 0.02 ; $n=59$; $P>0.05$; Figure 5A) in PANC-1, whereas we observed a significant decrease of Fura-2 fluorescence in TRPM7-silenced MIA PaCa-2 cells

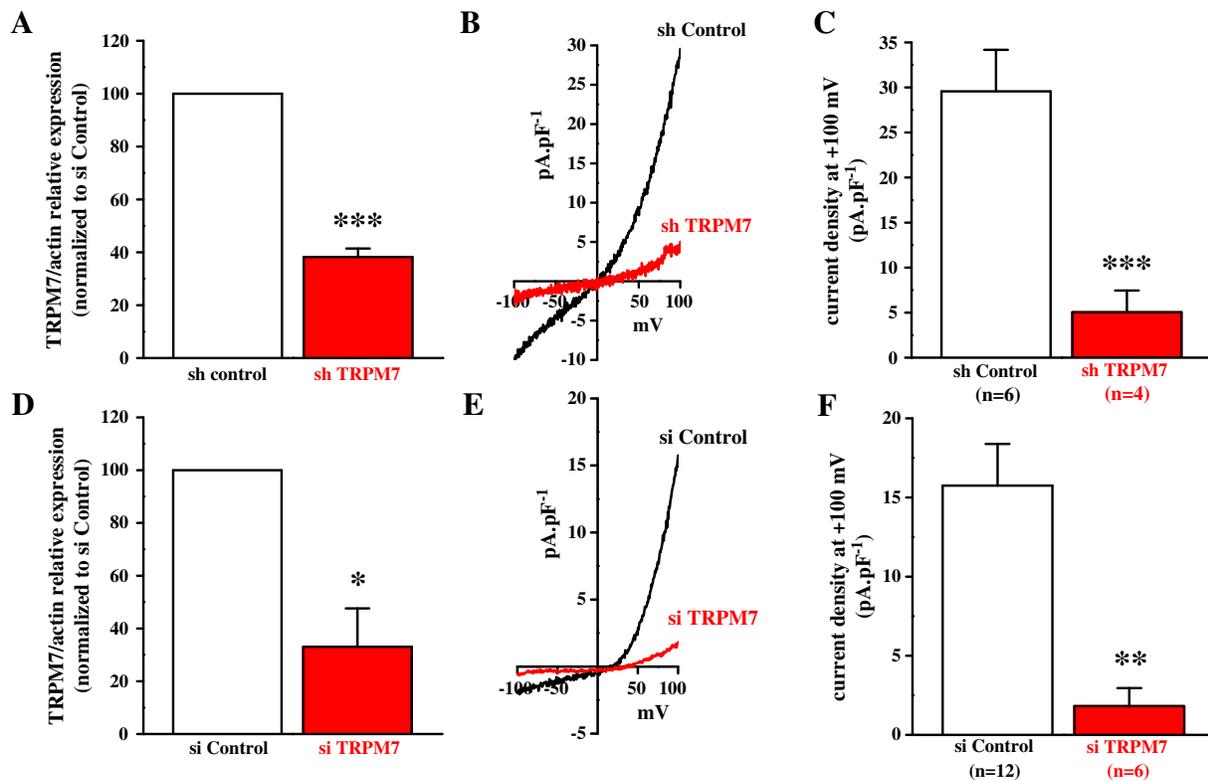


Figure 3. TRPM7 silencing inhibited MIC current in PDAC cells. (A) Effect of TRPM7 silencing by shRNA on TRPM7 mRNA expression in PANC-1 cells ($N=3$; $P<0.001$). (B) TRPM7 silencing by shRNA inhibits MIC currents in PANC-1 cells (averaged traces of six recordings for sh-Control and four recordings for sh-TRPM7 conditions). (C) Outward MIC currents recorded at +100 mV are decreased in cells treated with sh-TRPM7 ($n=4$ cells) when compared to control ($n=6$ cells; $P<0.001$). (D) TRPM7 silencing with siRNA decreases mRNA expression in MIA PaCa-2 ($N=3$; $P<0.05$). (E) MIC currents were decreased in MIA PaCa-2 cells transfected with siRNA (averaged trace of 6 recordings) when compared to controls (averaged trace of 12 recordings). (F) Outward MIC currents recorded at +100 mV are decreased in cells treated with si-TRPM7 ($n=6$ cells) when compared to control ($n=12$ cells; $P<0.01$).

(1.14 ± 0.01 ; $n=85$) when compared to si-Control (1.24 ± 0.02 ; $n=96$; $P<0.001$; Figure 5B). These results indicate that TRPM7 regulation of Ca^{2+} homeostasis seems dependent of the cell line.

Stable TRPM7 silencing induces a significant decrease of Mg^{2+} basal fluorescence from 0.67 ± 0.02 in sh-Control ($n=110$) to 0.61 ± 0.01 in sh-TRPM7 induced in PANC-1 ($n=132$; $P<0.001$; Figure 5C). Intracellular basal Mg^{2+} level regulation by TRPM7 is also observed in MIA PaCa-2 because TRPM7 silencing decreases MagFura-2 fluorescence from 0.79 ± 0.01 in control ($n=105$) to 0.74 ± 0.01 in transfected cells ($n=105$; $P<0.01$; Figure 5D). These data confirm that TRPM7 is mainly involved in Mg^{2+} homeostasis in cancer pancreatic cells.

Role of TRPM7 in PDAC Cell Invasion

TRPM7 channels are involved in cancer cell proliferation, migration, and invasion. It has been shown that TRPM7 reduces chemotaxis-induced invasion in pancreatic cancer cell lines [25]. In this study, we are interested in the role of TRPM7 in PDAC basal cell invasion, without any external stimulation. TRPM7 silencing has no effect on PANC-1 and MIA PaCa-2 cell proliferation measured at 24, 48, and 72 hours (Figure 6A). On the other hand, TRPM7 knockdown decreased basal cell invasion by $74.45\pm 1.54\%$ ($n=120$; $N=3$) when compared to control ($100\pm 4.94\%$; $n=120$; $N=3$; $P<0.001$) in PANC-1 and by $65.69\pm 2.95\%$ ($n=100$; $N=3$) when compared to control ($100\pm 6.88\%$; $n=100$; $N=3$; $P<0.001$;

Figure 6B) in MIA PaCa-2 cells. The effect of TRPM7 silencing on cancer pancreatic cell invasion cannot be attributed to an effect on cell viability because there is no effect on MTT assays performed at the same time as invasion assays (Figure 6C). Taken together, these data suggest that TRPM7 regulates cell invasiveness in PDAC cells.

Role of TRPM7 in the Hsp90 α /uPA/MMP-2 Proteolytic Pathway

Cell invasiveness is related to matrix metalloproteinases (MMPs) secretion and extracellular matrix degradation. Thus, we assessed the effect of TRPM7 silencing on protease secretion using gelatin zymography technique (Figure 7). Pro-MMP-2 secretion is decreased by $52\pm 5\%$ in PANC-1 transfected with sh-TRPM7 when compared to sh-Control ($N=3$; $P<0.001$; Figure 7, A and B). Furthermore, TRPM7 silencing also decreased the urokinase-type plasminogen activator (uPA) secretion by $58\pm 9\%$ when compared to sh-Control ($N=3$; $P<0.05$; Figure 7, C and D). Moreover, we also detected the inhibition of the heat-shock protein 90 alpha (Hsp90 α) secretion following stable TRPM7 silencing ($38\pm 3\%$; $N=3$; $P<0.01$; Figure 7, E and F). Similar results are found in MIA PaCa-2 cells transfected with siTRPM7. Indeed, TRPM7 silencing inhibited pro-MMP-2 and uPA secretions, respectively, by $27\pm 9\%$ ($N=4$; $P<0.05$; Figure 7, A and B) and $41\pm 1\%$ ($N=3$; $P<0.05$; Figure 7, C and D). Finally, TRPM7 silencing also inhibited Hsp90 α secretion by $75\pm 1\%$ ($N=4$;

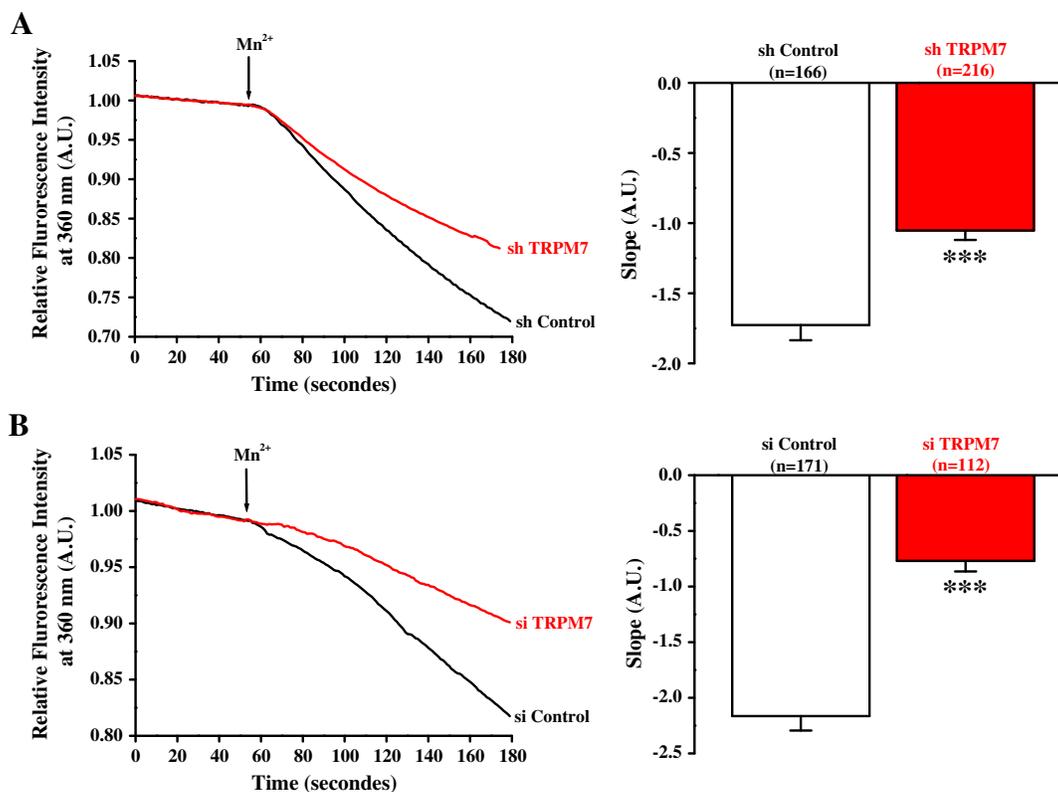


Figure 4. TRPM7 regulated a constitutive divalent cations entry in PDAC cells. (A) TRPM7 silencing induced by shRNA decreases Mn²⁺ quenching of Fura-2 fluorescence in PANC-1 cells (averaged trace of 216 cells) when compared to control (averaged trace of 166 cells), with a significant reduction of quenching slope induced in sh-TRPM7 cells (histograms; $P < 0.001$). (B) TRPM7 silencing also reduced Mn²⁺ quenching of Fura-2 fluorescence in MIA PaCa-2 cells (averaged trace of 112 cells) when compared to control (average trace of 171 cells), with a significant reduction of quenching slope in si-TRPM7 cells (histograms; $P < 0.001$).

$P < 0.05$; Figure 7F). Taken together, these results show that TRPM7 regulates the Hsp90 α /uPA/MMP-2 proteolytic pathway in PDAC cells.

Role of TRPM7 in Mg²⁺-entry and PDAC Cell Invasion

Extracellular Mg²⁺ elevation from 1 to 10 mM induces an increase of intracellular MagFura-2 fluorescence from 0.76 ± 0.01 to 0.77 ± 0.01 in control MIA PaCa-2 cells ($n=46$; $P < 0.001$ using a Wilcoxon signed rank test; Figure 8, A and B). On the other hand, TRPM7 silencing abolishes the increase of MagFura-2 fluorescence induced by 10 mM Mg²⁺, indicating that Mg²⁺ entry is mainly regulated by TRPM7 in MIA PaCa-2 cells ($n=62$; $P > 0.05$; Figure 8, A and B).

Furthermore, we assessed how external Mg²⁺ can regulate PDAC cell invasion and MMP secretion. External Mg²⁺ elevation from 1 to 10 mM increases MIA PaCa-2 cell invasion ($165.54 \pm 9.53\%$; $n=40$; $N=2$) when compared to control ($100 \pm 5.37\%$; $n=40$; $N=2$; $P < 0.001$; Figure 8C). TRPM7 silencing decreases cell invasion, but 10 mM external Mg²⁺ is not able to restore cell invasion ($70.95 \pm 4.38\%$; $n=40$; $N=2$) when compared to control ($54.32 \pm 3.43\%$; $n=40$; $N=2$; $P > 0.05$; Figure 8C). Finally, pro-MMP-2 secretion was increased ($141.31 \pm 11.25\%$; $N=4$) in external media containing 10 mM Mg²⁺ when compared to control media containing 1 mM Mg²⁺ ($100 \pm 8.48\%$; $N=4$; $P < 0.05$; Figure 8D). These results indicate that Mg²⁺ entry through TRPM7 channels is correlated with PDAC cell invasion and MMP secretions.

TRPM7 expression in metastatic lymph node

We have previously shown that TRPM7 is overexpressed in PDAC tissues in correlation with grade and survival [24]. Here, we study the expression of TRPM7 in PDAC and associated lymph nodes metastasis (LNM). We observed that TRPM7 expression in LNM is correlated with TRPM7 expression levels in PDAC primary tumor (Figure 9A). Indeed, a low TRPM7 staining in pancreatic tissue is associated to a low TRPM7 staining in lymph node samples (0.27 ± 0.07 ; $n=14$), whereas a high TRPM7 staining in pancreatic tissue is associated to a higher TRPM7 staining in lymph nodes (1.1 ± 0.16 ; $n=8$; $P < 0.001$; Figure 9B). These data show a strong association of the expression levels of TRPM7 in primary tumor and in metastatic PDAC cells that disseminate from the pancreas.

Discussion

In the present study, we show that TRPM7 channels are involved in PDAC cell invasiveness through the regulation of Hsp90 α /uPA/MMP-2 proteolytic pathway. The main results of this work are as follows: 1) TRPM7 regulates constitutive cation entry in PDAC cells and mainly in Mg²⁺ homeostasis and influx, 2) TRPM7 promotes basal PDAC cell invasion, 3) TRPM7 is required for Hsp90 α secretion leading to uPA and pro-MMP-2 activations and stabilizations, and 4) TRPM7 expression level is maintained from primary tumor to metastatic lymph nodes.

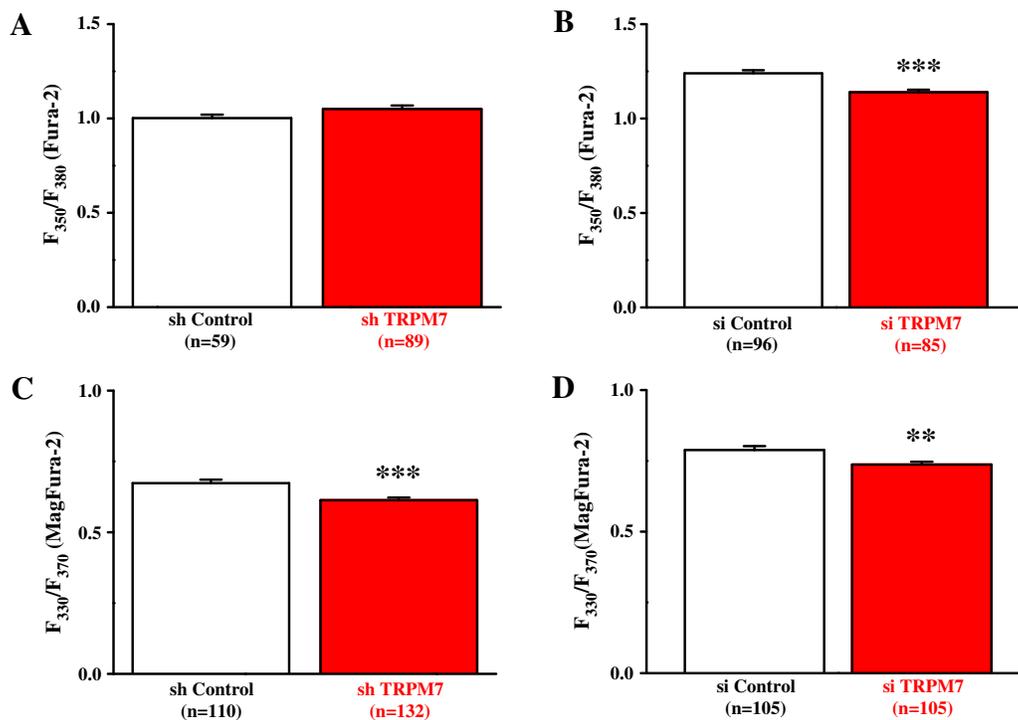


Figure 5. TRPM7 role in basal intracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} levels. Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis was assessed by basal Fura-2 and by MagFura-2 fluorescence ratio, respectively. (A) TRPM7 silencing by shRNA had no effect on PANC-1 basal Ca^{2+} levels ($n=89$ cells) when compared to control ($n=59$ cells; $P>0.05$). (B) Basal Ca^{2+} level is reduced in MIA PaCa-2 cells where TRPM7 has been silenced ($n=85$ cells) when compared to control ($n=96$ cells; $P<0.001$). (C) Basal Mg^{2+} level is reduced by TRPM7 silencing ($n=132$ cells) in PANC-1 when compared to control ($n=110$ cells; $P<0.001$). Basal Mg^{2+} level is also reduced in MIA PaCa-2 cells transfected with si-TRPM7 ($n=105$ cells) when compared to control ($n=105$ cells; $P<0.01$).

We previously showed that TRPM7 is overexpressed in PDAC tissues in correlation with cancer grade and patient survival [24]. We also demonstrated that TRPM7 regulates BxPC-3 cell migration and basal cytosolic Mg^{2+} [24]. However, although BxPC-3 is one of the most commonly used PDAC cell lines, it is probably not representative of the majority of pancreatic cancers [31]. Indeed, BxPC-3 cells contain wild-type RAS, whereas KRAS mutation occurs in almost all PDACs. Then, we assessed the role of TRPM7 in PANC-1 and MIA PaCa-2 PDAC cell lines with mutated KRAS. Moreover, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells are more tumorigenic because they produce the largest tumors *in vivo* than BxPC-3 cells [31]. To our knowledge, no relation has been made between mutated KRAS and TRPM7 expression or activity. However, Meng et al. [18] showed that TRPM7 regulates MDA-MB-435 migration and invasion through MAPK pathway. As MAPK pathway is often activated by constitutive KRAS activity in cancer, an interaction between TRPM7 and KRAS could be possible. Further experiments are needed to assess the relation between TRPM7 and KRAS in the regulation of PDAC cell invasion.

Our present work, in accordance with a recent publication from Yee's laboratory [25], confirms that TRPM7 is involved in PDAC progression and PDAC cell ability to migrate and invade. Several studies have reported the involvement of TRPM7 in cell migration and invasion induced by fetal calf serum (FCS) as chemoattractant in breast [18,26], nasopharyngeal [20,21], and pancreatic cancer cells [25]. In our work, it is important to note that we do not use any stimulation (by chemotaxis or activator) to promote cell invasion. Our data strongly indicate that TRPM7 is constitutively active at the plasma membrane of PDAC cells, leading to sustained cation entry

and enhanced invasion without any stimulation by chemoattractant or activator. These results are important because they show that TRPM7 is an integral membrane protein that promotes PDAC cell invasiveness independently of external stimuli. However, the molecular mechanisms involved in TRPM7 constitutive activation remain unclear and are still under debate. The MIC current recorded in TRPM7 is inhibited by free intracellular Mg^{2+} within the micromolar range [13,14,32]. In our experiments, we show that TRPM7 current is abolished by 680 and 850 μM free $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in PANC-1 and BxPC-3 cells [24], respectively. If we assume that cytosolic resting Mg^{2+} levels are in the millimolar range in most cells [33], TRPM7 should be inhibited at physiological cytosolic Mg^{2+} levels. There is evidence that Mg^{2+} homeostasis is altered in cancer [34]. For example, Mg^{2+} deficiency promotes metastasis in a model of mice xenograft [35]. Interestingly, free $[\text{Mg}^{2+}]_i$ measurements in human colon carcinoma cells using fluorescent probes show low cytosolic free Mg^{2+} under 0.3 mM [36]. Moreover, a recent study on rat glioma shows that the cancer tissue and the single infiltrating cancer cells contain elevated levels of bound Mg when compared to the noncancer ones [37]. Indeed, elevated bound Mg in cancer may buffer free Mg^{2+} , leading to low intracellular free Mg^{2+} that allows a sustained Mg^{2+} influx through TRPM7. Further experiments on free $[\text{Mg}^{2+}]_i$ measurements in PDAC cells are definitely needed to better understand how TRPM7 is constitutively active.

TRPM7 is a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ permeable channel involved in both divalent cation homeostases. In PDAC, we show that TRPM7 silencing affects divalent cation homeostasis in a cell line-dependent manner. Indeed, TRPM7 silencing decreases basal cytosolic Mg^{2+}

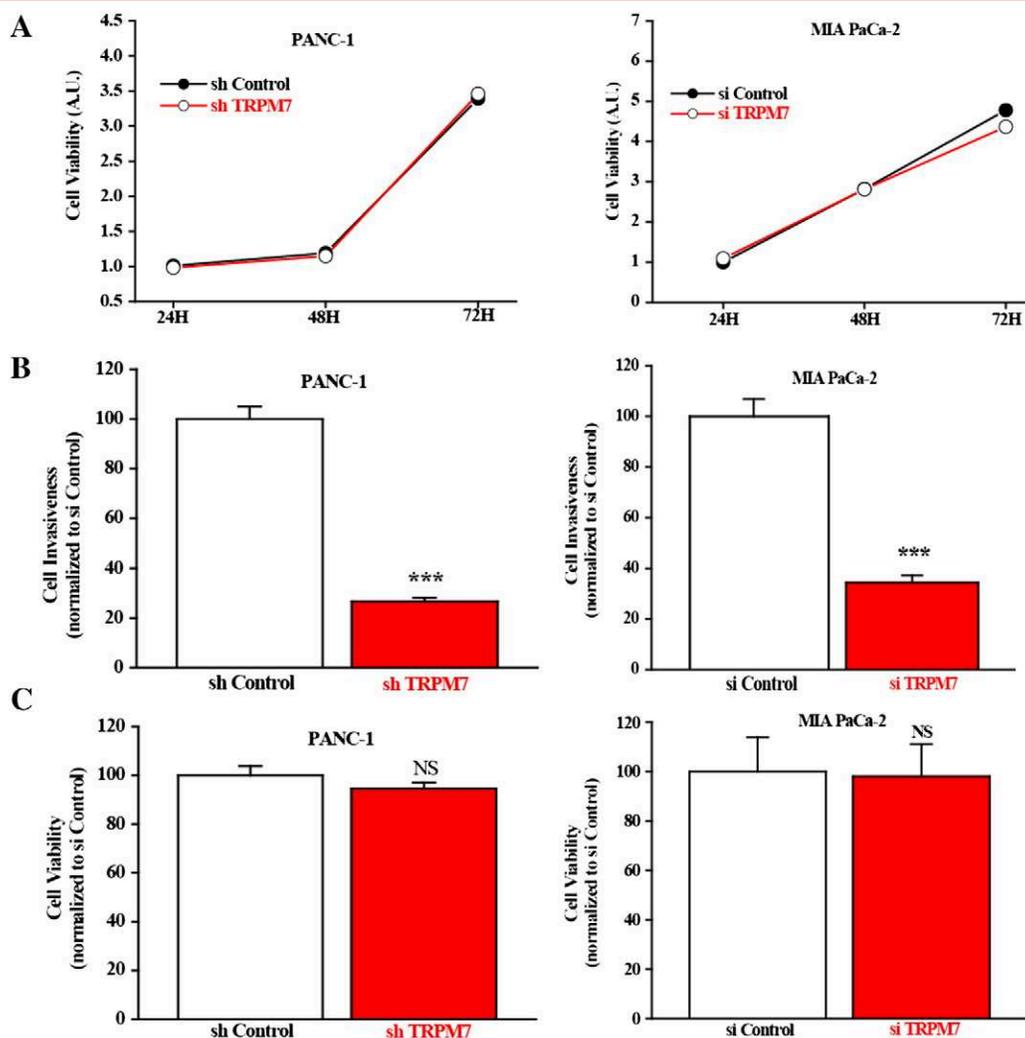


Figure 6. TRPM7 regulated PDAC cell invasiveness. (A) PANC-1 and MIA PaCa-2 cell proliferation was not affected by TRPM7 silencing ($n=12$ counting; $N=3$ for each time tested; $P>0.05$). (B) Both PANC-1 and MIA PaCa-2 cell invasion (40.10^4 cells, 24 hours) assessed in Matrigel modified Boyden chambers was decreased by TRPM7 silencing when compared to control ($n=120$ counting; $N=3$ for PANC-1; $n=100$ counting; $N=3$ for MIA PaCa-2; $P<0.001$ for each PDAC cell line). (C) Cell viability assessed by MTT assays (40.10^4 cells, 24 hours) showed no effect of TRPM7 for PANC-1 cells ($n=12$ counting; $N=3$; $P>0.05$) and for MIA PaCa-2 cells ($n=12$ counting; $N=3$; $P>0.05$).

levels in PANC-1 and MIA PaCa-2 as previously shown in BxPC-3 cells [24]. Moreover, we show that TRPM7 silencing decreases the Mg^{2+} influx induced by the increase of external Mg^{2+} . Taken together, our data strongly indicate that TRPM7 mainly regulates Mg^{2+} homeostasis and influx in PDAC cells.

One of the novelties of our work is that we clearly established a link between TRPM7 expression and a proteolytic pathway in PDAC cells. Indeed, TRPM7 silencing dramatically inhibits Hsp90 α secretion and both uPA and pro-MMP-2 secretions in the two cell lines. A recent study showed that inhibiting TRPM7 by siRNA or by pharmacological blocker (carvacol) decreased membrane MMP-2 expression and cell invasion in glioblastoma [17], indicating a regulation of MMP expression by TRPM7. The Hsp90 α /uPA/MMP-2 proteolytic pathway is activated by elastin peptides, leading to enhanced cell migration and invasion in fibrosarcoma [38]. There is increased interest in the development of Hsp90 inhibitors for cancer therapy [39,40]. Indeed, aberrant Hsp90 α ectopic localization in cancer cells led to cancer progression and enhanced aggressiveness,

whereas blocking secreted Hsp90 α has an inhibitory effect on metastatic behavior [40]. Moreover, high plasma Hsp90 α levels are positively correlated with tumor malignancy in clinical tumor patients [41]. The main biological role of secreted Hsp90 α is to interact with MMP-2, leading to protease activation and cancer cell invasiveness [42,43]. Moreover, Hsp90 α secretion also activates uPA system [38,44], which is largely involved in cancer metastasis [45]. Indeed, uPA system suppression retards both cell invasion and *in vivo* tumor development in PDAC [46]. How cancer cells constitutively secrete Hsp90 α is still largely unknown. To our knowledge, we report, for the first time, that Hsp90 α secretion is regulated by TRPM7. However, the molecular mechanisms involved in Hsp90 α secretion induced by TRPM7 are still unknown. Several hypotheses are possible due to the dual function of TRPM7. In the present study, we show that TRPM7 induced a constitutive divalent cations entry in PDAC cells. It has been shown that divalent cations such as Mg^{2+} and Ca^{2+} stabilize Hsp90 oligomerization [47]. Furthermore, Hsp90 α plasma membrane translocation is regulated by cytosolic Ca^{2+} levels

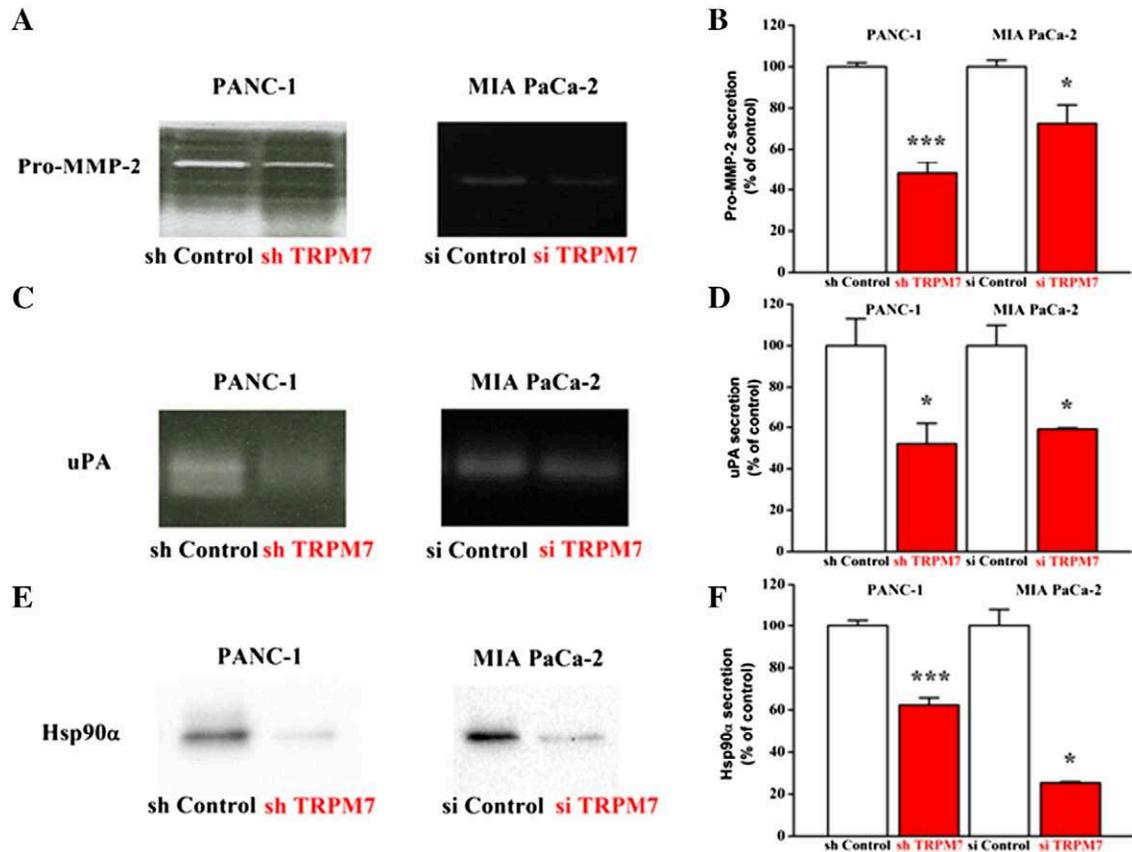


Figure 7. TRPM7 regulates Hsp90 α /uPA/MMP-2 pathway in PDAC cells. (A) Typical examples of reduced Pro-MMP-2 secretion following TRPM7 silencing in PANC-1 cells (left panel) and in MIA PaCa-2 cells (right panel). (B) Quantification of decreased pro-MMP-2 secretion induced by TRPM7 silencing in both PANC-1 cells ($N=3$) and MIA PaCa-2 cells ($N=4$). (C) Typical examples of reduced uPA secretion following TRPM7 silencing in PANC-1 cells (left panel) and MIA PaCa-2 cells (right panel). (D). Quantification of decreased uPA secretion induced by TRPM7 silencing in both PANC-1 cells ($N=3$) and MIA PaCa-2 cells ($N=3$). (E) Typical examples of reduced Hsp90 α secretion following TRPM7 silencing in PANC-1 cells (left panel) and in MIA PaCa-2 cells (right panel). (F) Quantification of decreased Hsp90 α secretion induced by TRPM7 silencing in both PANC-1 cells ($N=3$) and MIA PaCa-2 cells ($N=4$).

[48]. Taken together, these data indicate that Ca^{2+} and Mg^{2+} are important for Hsp90 α stabilization and secretion. Thus, it is tempting to speculate that TRPM7 provides a constitutive $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pore leading to Hsp90 α secretion. Moreover, one of the posttranslational modifications that promote Hsp90 α secretion is phosphorylation on threonine residues [40]. Indeed, Hsp90 α phosphorylation by protein kinase A and C on threonine residues leads to its secretion and malignancy [41,49]. In full agreement with these studies, it was shown that TRPM7 kinase domain is required for human breast cancer cell migration [19] and metastasis [26]. Moreover, cytosolic Mg^{2+} has been implicated in the activation of TRPM7 phosphotransferase activity [50,51]. Thus, constitutive Mg^{2+} entry through TRPM7 channel could induce sustained kinase activation, leading to Hsp90 α phosphorylation and secretion in PDAC cells. Nevertheless, further studies are needed to determine whether TRPM7 kinase could phosphorylate Hsp90 α , leading to secretion and PDAC enhanced cell invasiveness.

From a clinical point of view, our study confirms that TRPM7 could be a promising target in PDAC. It was previously shown that TRPM7 overexpression in PDAC tissues is positively correlated with cancer progression and poor survival [24,25]. Here, we show that high TRPM7 expression is also found in metastatic lymph nodes. Taken together, our work strongly suggests that TRPM7 is required for metastatic dissemination of PDAC cells.

In conclusion, we provide a new molecular mechanism involving TRPM7 in PDAC cell invasiveness. Indeed, TRPM7 activity through Mg^{2+} constitutive entry and possibly kinase activation could lead to Hsp90 α secretion inducing MMP-2 and uPA system activations, both enhancing PDAC cell invasiveness (Figure 10).

Materials and Methods

Human pancreatic cancer cell lines PANC-1 (ATCC CRL-1469) and MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420) were used for this study. These cell lines were derived from a poorly differentiated tumor which corresponds to a grade 3 PDAC [31]. PANC-1 and MIA PaCa-2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (Lonza). Cells were trypsinized once a week using trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and incubated at +37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 .

TRPM7 Silencing Using siRNA and shRNA

Transient silencing of TRPM7 was performed using siRNA as previously described [24]. Briefly, siRNAs were included in pancreatic cancer cells by nucleofection using a Nucleofector™ II device (Lonza). PANC-1 and MIA PaCa-2 cells (10^6 cells) were transfected with 2 μg of siRNA (corresponding to 1.5 μM) according to the optimized protocol recommended by Lonza. PANC-1 and

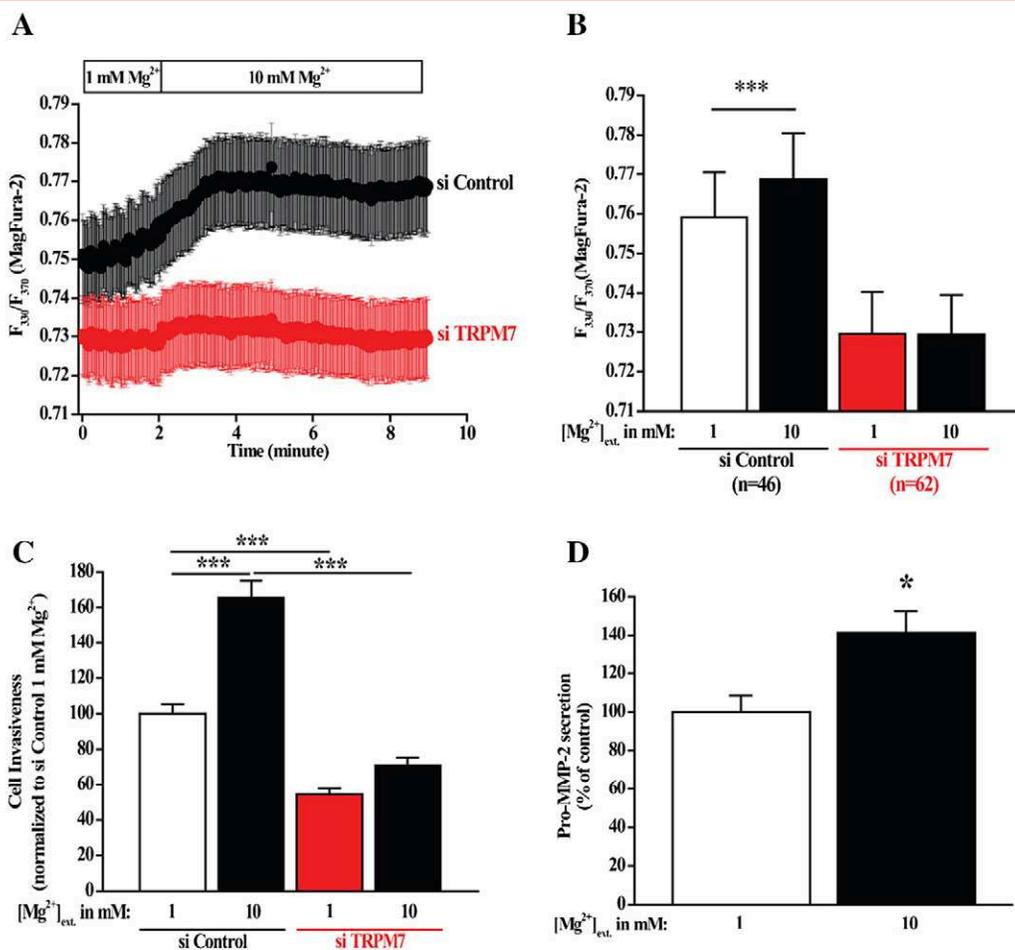


Figure 8. Extracellular Mg^{2+} regulates cell invasion through TRPM7 channels. (A) External application of 10 mM Mg^{2+} at 2 minutes induced a slight but sustained increase of intracellular Mg^{2+} levels in si-Control MIA PaCa-2 (black trace, $n=46$), whereas no effect was observed in si-TRPM7 condition (red trace, $n=62$). (B) Quantification of intracellular MagFura-2 fluorescence following 9-minute application of 10 mM Mg^{2+} in si-Control ($n=46$) and si-TRPM7 MIA PaCa-2 ($n=62$) indicating that TRPM7 mediates Mg^{2+} entry ($P < 0.001$ using paired Wilcoxon signed tests). (C) External application of 10 mM Mg^{2+} increases MIA PaCa-2 invasion in si-Control but not in si-TRPM7 condition ($n=40$ counting; $N=2$ passages; $P < 0.001$ using two-way analysis of variance followed by Holm-Sidak tests). (D). Pro-MMP-2 secretion is increased by adding 10 mM Mg^{2+} in culture media ($N=4$; $P < 0.05$).

MIA PaCa-2 cells were nucleofected with a scrambled siRNA (si-Control) or with a siRNA targeting TRPM7 (si-TRPM7) (targeting nucleotide sequence: 5'-GTC-TTG-CCA-TGA-AA-T-ACT-C-3'). We also used shRNAs for stable and inducible TRPM7 silencing. PANC-1 cells were transfected with shTRPM7 and shControl by nucleofection (10^6 cells with 1 μ g plasmid). Cells with shRNAs were selected following puromycin incubation at the concentration of 800 $ng \cdot ml^{-1}$. Stable TRPM7 silencing was induced by doxycycline treatment (2 μ g $\cdot ml^{-1}$). All si- and shRNAs were purchased from Dharmacon Research Inc., USA.

All the experiments were made in the 48 hours following the nucleofection and in the 72 hours following shRNA induction by doxycycline treatment.

RT-PCR and Quantitative RT-PCR

RNA extraction was performed using the standard Trizol-phenol-chloroform protocol. Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed into cDNA with random hexamers and MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). PCRs were carried out using an iCycler thermal cycler (Biorad) and Taq DNA

polymerase (Invitrogen) with, respectively, 30 and 40 cycles for β -actin and TRPM7 primers. PCR products were visualized on agarose gels and quantified using Quantity One Software (Biorad). Results were expressed as TRPM7 expression normalized to β -actin expression for semiquantitative RT-PCR experiments. Quantitative RT-PCR was performed on a LightCycler system (Roche) using a mix containing SYBR green (Applied Biosystem). TRPM7 mRNA quantities were normalized to β -actin as a housekeeping gene.

Western Blotting Experiments

Cells were lysed 30 minutes on ice in radioimmunoprecipitation assay buffer (1% Triton X-100, 1% Na deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM PO_4Na_2/K , pH 7.2) supplemented with Sigma P8340 inhibitors cocktail, 2 mM EDTA, and 5 mM orthovanadate. After sonication and centrifugation at 13,000 rpm, the proteins in the supernatant were quantified using the BCA method (BioRad). Equal amounts of each protein sample (50 μ g) were separated by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membrane (Amersham). Blots were incubated with antibodies raised against TRPM7 (1/1000,

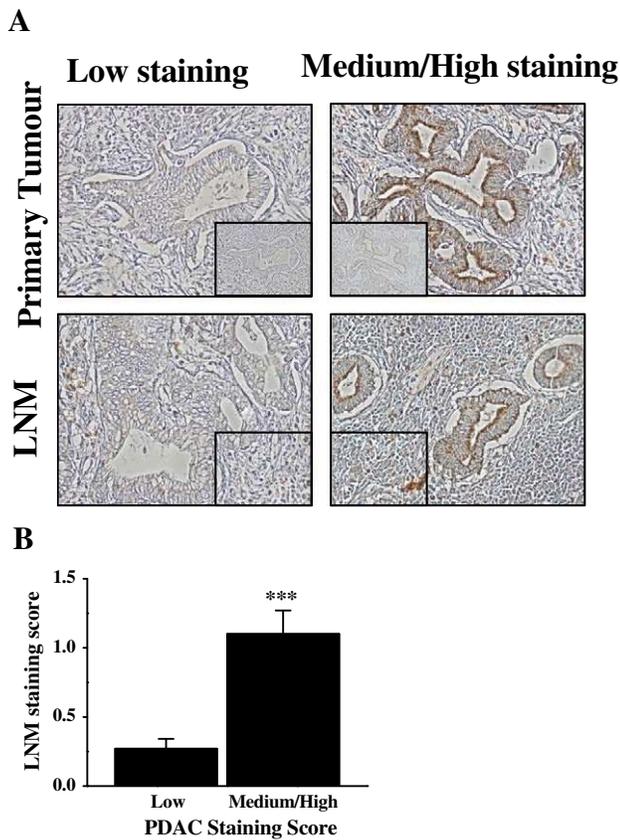


Figure 9. TRPM7 expression in human PDAC and LNM. (A) Examples of low (left panels) and high (right panels) apical and membranous staining in pancreatic (upper panels) and LNM (lower panels) tumor cells using TRPM7 antibody. (Inserts) Negative control obtained by omitting the primary antibody. (B) Correlation between pancreatic ($n=13$) and LNM ($n=22$) staining score for TRPM7 ($P<0.001$).

Abcam) and actin (1/1000, Santa Cruz Biotechnology) and developed with the enhanced chemiluminescence system using specific peroxidase-conjugated anti-IgG secondary antibodies.

Electrophysiology

TRPM7 currents were recorded using the conventional technique of patch clamp in the whole-cell configuration. Holding membrane potential was held to -40 mV, and currents were elicited by a ramp depolarization from -100 mV to $+100$ mV for 350 milliseconds. Interval between each ramp depolarization was 10 seconds. The patch pipettes (3–5 M Ω) were made from hematocrit glass using a vertical puller (P30 vertical micropipette puller, Sutter Instrument Co.). The extracellular solution was composed of the following (in mM): Na-gluconate 140; K-gluconate 5; Mg-Gluconate 2; Ca-gluconate 2; HEPES 10; glucose 5; TEA-Cl 5 (pH adjusted to 7.4 with NaOH). The intrapipette solution was composed of the following (in mM): Cs-gluconate 145; Na-gluconate 8; EGTA 10; Mg-gluconate or MgATP (as indicated); HEPES 10 (pH adjusted to 7.2 with CsOH). Free $[Mg^{2+}]_i$ was estimated using the program WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>). Signals were filtered at 1 kHz and digitized at 5 kHz using an Axopatch 200B patch clamp amplifier (Molecular Devices Inc.) combined with a 1322A Digidata (Molecular Devices Inc.). The

MIC current was recorded after the dialysis of intracellular media by 0 Mg intrapipette solution. The MIC current was calculated as the difference between the steady-state current activated by the depletion of $[Mg^{2+}]_i$ and the basal current recorded few minutes after patch rupture. MIC currents were expressed as current densities (in $pA \cdot pF^{-1}$) by dividing the current intensity (in pA) by the cell capacitance (in pF). Electrophysiological protocols and analyses were made using pClamp 10, Clampfit (both by Molecular Devices), and Origin 6.0 (Microcal Software, Inc.). All experiments were performed at room temperature.

Cell Imaging

PDAC cells were plated on glass coverslips in 35-mm diameter dishes at a density of 8.10^4 cells. After 48 hours, cells were loaded in cell growth medium at $+37^\circ C$ for 1 hour with 3 μM Fura 2-AM (Sigma-Aldrich) or 3 μM Mag-Fura 2-AM (Invitrogen) and subsequently washed three times with the extracellular solution. The coverslip was then transferred onto a perfusion chamber on a Zeiss microscope equipped for fluorescence.

To estimate the divalent cation influx, we used Mn^{2+} quenching as previously published [24]. Cells were perfused for 1 minute with extracellular solution containing (in mM) 145 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, and 5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH). After this period, Ca^{2+} was replaced by Mn^{2+} (2 mM). To measure Mn^{2+} influx, cells were excited at 360 nm with a monochromator (TILLVR Photonics, Munich, Germany), and fluorescence emission was monitored at 510 nm by a CCD camera coupled to a Zeiss inverted microscope (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, Oberkochen, Germany). After Mn^{2+} perfusion, the decrease of Fura-2 fluorescence described a linear decay, and the slope is correlated with the rate of the Mn^{2+} influx. The calculated slope is obtained by subtracting the slope of basal decreasing Fura-2 fluorescence obtained in basal conditions (culture conditions) and after Mn^{2+} application. To measure the Ca^{2+} basal fluorescence ratio, PANC-1 and MIA PaCa-2 were incubated with Fura-2AM as previously indicated. Cells were then perfused with the extracellular solution containing 2 mM of Ca^{2+} . Cells were excited alternatively at 350 nm and 380 nm. The fluorescence emission was monitored at 510 nm. The ratio of Fura-2 fluorescence intensities measured with excitation at 350 and 380 nm (F_{350}/F_{380}) was used as a $[Ca^{2+}]_i$ -related signal. The same protocol was used for Mg^{2+} basal ratio, but cells were perfused by extracellular solution which contained 1 mM Mg^{2+} , and MAG-Fura-2AM was used as a fluoroprobe. The ratio of MAG-Fura-2 fluorescence intensities measured with excitation at 330 and 370 nm (F_{330}/F_{370}) was used as a $[Mg^{2+}]_i$ -related signal.

Cell Migration and Invasion Assays

Migration tests were performed in 8- μm pore size polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts (BD FALCON Cell Culture Inserts, BD Biosciences). The upper compartment was seeded with 4×10^4 cells of 24-hour transfected PANC-1 cells (scramble or siTRPM7) in growth medium supplemented with 10% FCS. The lower compartment was also filled with growth medium supplemented with 10% FCS. Thus, migration and invasion assays were performed without addition of chemoattractant. After 24 hours of further incubation at $37^\circ C$, the remaining cells were removed from the upper side of the membrane by scrubbing. Migrated cells on the lower side were washed by phosphate-buffered saline, fixed by methanol, and stained by hematoxylin. Migrated cells were counted

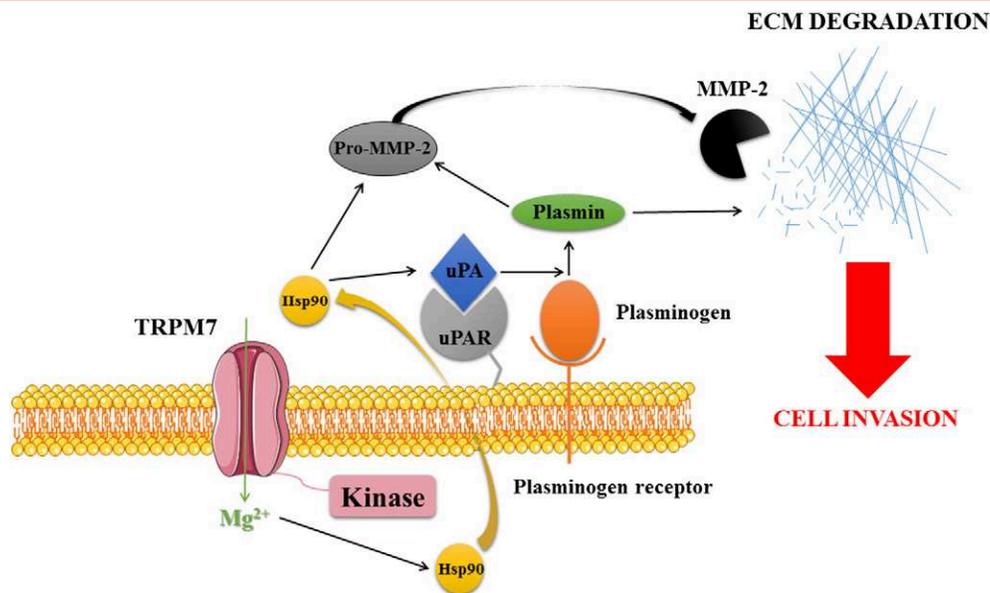


Figure 10. Graphical conclusion. TRPM7 is involved in basal Mg²⁺ influx in PDAC cells and secretion of Hsp90 α . Hsp90 α stabilizes both pro-MMP-2 and uPA/plasmin pathway that in turn enhances extracellular matrix (ECM) degradation and PDAC cell invasiveness.

under an inverted microscope (Zeiss) in duplicate (20 contiguous areas at $\times 400$ magnification for each insert). For each experiment, the number of migrating cells per area for each condition (scramble or siTRPM7) was normalized by the mean of scramble migrating cells. Experiments were repeated in three different passages. For each passage, an MTT test was carried out in the same condition as the migration assays (24 hours after cell nucleofection). Invasion assays were made in the same manner as that for migration. The upper side of the migration inserts was coated with Matrigel.

Proteinase and Hsp90 Detection

Conditioned media from PANC-1 and MIA PaCa-2 cell cultures were analyzed for gelatin degradation by electrophoresis under nonreducing conditions on an SDS-polyacrylamide gel containing 1 mg/ml of gelatin with or without 3 μ g/ml of plasminogen. The volume of conditioned medium loaded per lane was standardized on the basis of the cell count at harvest. Following electrophoresis, gels were incubated overnight at +37°C in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl₂, pH 7.4, for matrix metalloproteinase detection and 100 mM glycine buffer and EDTA 5 mM, pH 8.3, for plasminogen activator detection. Gelatinolytic activity resulting from proteinase presence was indicated here by white lysis zones which were revealed by staining with Coomassie brilliant blue. As a positive control, HT-1080 conditioned medium was used.

To detect secreted Hsp90, conditioned media were concentrated in Vivaspin from Sartorius stedim (Aubagne, France), and samples were electrophoresed in a 0.1% SDS, 10% polyacrylamide gel, under reducing conditions. Proteins were then transferred onto Immobilon-P membrane (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20 in a 50-mM Tris-HCl buffer, 150 mM NaCl, pH 7.5 (TBS), for 2 hours at room temperature and incubated overnight at +4°C with anti-Hsp90 antibody (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) and then for 1 hour at room temperature with a second peroxidase-conjugated anti-IgG antibody. Immune complexes were

visualized with the enhanced chemoluminescence detection kit (GE Healthcare, Orsay, France).

TRPM7 Detection in PDAC and Associated Lymph Nodes

Human tissues samples from PDAC ($n=13$) including LNM ($n=22$) were used with the agreement of patients treated by surgery in the University Hospital of Amiens (Picardie, France). Experiments on human tissues were approved by the Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Picardie (Amiens, France). Histological examination was performed by an experimented pathologist (D.C.) on paraffin-embedded tissues using hematoxylin-phloxin-saffron staining.

Immunohistochemistry was performed in duplicate for each sample using the indirect immunoperoxidase staining technique on the paraffin-embedded material with a Ventana XT instrument (Ventana Medical Systems, Roche Diagnostics) and a hematoxylin counterstain as previously described [24]. The sections were incubated with anti-TRPM7 antibody (Chemicon, 1/300), and negative controls were performed by omitting the primary antibodies. Analysis of tissue section was done by light microscopy by a pathologist (D.C.) at $\times 400$ magnification. Because PDAC tissues showed a nonhomogenous staining, TRPM7 staining in human PDAC was determined by the previously published method [52]. Briefly, the percentages of tumor cells (in well differentiated and undifferentiated areas) that were stained at each of the intensity score 0 (no staining), 1 (weak staining), 2 (moderate staining), and 3 (strong staining) were added, and the sum of these scores gave a final score for each tissue ranging from 0 to 0.99 (weak TRPM7 staining), 1 to 1.99 (moderate TRPM7 staining), or 2 to 2.99 (strong TRPM7 staining).

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM, n refers to the number of separate experiments or to the number of cells, and N refers to the number of cell line passages. Statistical analyses were made using Student's t tests or Mann-Whitney rank sum test depending on sample normality or paired Wilcoxon signed rank test using Sigma-Stat 3.0 (Systat Software, Inc.).

When more than two conditions were compared, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used followed by Dunn's method *post hoc* tests using SigmaStat 3.0 (Systat Software, Inc.).

Funding

P. R. was a recipient of funding from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A. V. is a recipient of funding from the Conseil Régional de Picardie. This work was supported by FEDER, la Ligue Contre le Cancer (Septentrion), and la SFR CAP-Santé (FED 4231).

Conflict of Interest Statement

None.

Acknowledgements

The authors thank Aurélie Dupont-Deshorgue and Marie-Pierre Mabile for their technical help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.01.004>.

References

- Hariharan D, Saied A, and Kocher HM (2008). Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB (Oxford)* **10**, 58–62.
- Stathis A and Moore MJ (2010). Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 163–172.
- Prevarskaya N, Skryma R, and Shuba Y (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* **11**, 609–618.
- Stock C and Schwab A (2015). Ion channels and transporters in metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2638–2646.
- Huang X and Jan LY (2014). Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* **206**, 151–162.
- Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A, and Pardo LA (2016). Kv10.1K(+) channel: from physiology to cancer. *Pflugers Archiv* **468**, 751–762.
- Pardo LA and Stuhmer W (2014). The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 39–48.
- Stewart TA, Yapa KT, and Monteith GR (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2502–2511.
- Vashisht A, Trebak M, and Motiani RK (2015). STIM and Orai proteins as novel targets for cancer therapy. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* **309**, C457–C469.
- Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, and Shuba Y (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, 20130097.
- Besson P, Driffort V, Bon E, Gradek F, Chevalier S, and Roger S (2015). How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells? *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2493–2501.
- Fraser SP, Ozerlat-Gunduz I, Brackenbury WJ, Fitzgerald EM, Campbell TM, Coombes RC, and Djamgoz MB (2014). Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, 20130105.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurotaki T, Kinet JP, Penner R, and Scharenberg AM, et al (2001). LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**, 590–595.
- Runnels LW, Yue L, and Clapham DE (2001). TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043–1047.
- Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, Fleig A, van Leeuwen FN, and Jalink K (2013). TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium* **54**, 404–415.
- Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, Moolenaar WH, Jalink K, and van Leeuwen FN (2006). TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J* **25**, 290–301.
- Chen WL, Barszczyk A, Turlova E, Deurloo M, Liu B, Yang BB, Rutka JT, Feng ZP, and Sun HS (2015). Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget* **6**, 16321–16340.
- Meng X, Cai C, Wu J, Cai S, Ye C, Chen H, Yang Z, Zeng H, Shen Q, and Zou F (2013). TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Lett* **333**, 96–102.
- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H, Scharenberg AM, and Ouadid-Ahidouch H (2013). Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur J Cancer* **49**, 3694–3707.
- Chen JP, Luan Y, You CX, Chen XH, Luo RC, and Li R (2010). TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca(2+) influx. *Cell Calcium* **47**, 425–432.
- Chen JP, Wang J, Luan Y, Wang CX, Li WH, Zhang JB, Sha D, Shen R, Cui YG, and Zhang Z, et al (2015). TRPM7 promotes the metastatic process in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* **356**, 483–490.
- Gao H, Chen X, Du X, Guan B, Liu Y, and Zhang H (2011). EGF enhances the migration of cancer cells by up-regulation of TRPM7. *Cell Calcium* **50**, 559–568.
- Sun Y, Sukumaran P, Varma A, Derry S, Sahnoun AE, and Singh BB (2014). Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1839–1850.
- Rybarczyk P, Gautier M, Hague F, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Kerr-Conte J, Pattou F, Regimbeau JM, Sevestre H, and Ouadid-Ahidouch H (2012). Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is over-expressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer* **131**, E851–861.
- Yee NS, Kazi AA, Li Q, Yang Z, Berg A, and Yee RK (2015). Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis. *Biol Open* **4**, 507–514.
- Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horssen R, Wieringa B, Canisius SV, Zwart W, and Wessels LF, et al (2012). TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res* **72**, 4250–4261.
- Middelbeek J, Visser D, Henneman L, Kamermans A, Kuipers AJ, Hoogerbrugge PM, Jalink K, and van Leeuwen FN (2015). TRPM7 maintains progenitor-like features of neuroblastoma cells: implications for metastasis formation. *Oncotarget* **6**, 8760–8776.
- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Haren N, Sevestre H, and Ouadid-Ahidouch H (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C493–C502.
- Mederos y Schnitzler M, Waring J, Gudermann T, and Chubanov V (2008). Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *FASEB J* **22**, 1540–1551.
- Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurotaki T, Fleig A, and Scharenberg AM (2003). Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191–200.
- Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, and Mulvihill SJ (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* **39**, 425–435.
- Chokshi R, Matsushita M, and Kozak JA (2012). Sensitivity of TRPM7 channels to Mg²⁺ characterized in cell-free patches of Jurkat T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C1642–C1651.
- de Baaij JH, Hoenderop JG, and Bindels RJ (2015). Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* **95**, 1–46.
- Trapani V, Arduini D, Cittadini A, and Wolf FI (2013). From magnesium to magnesium transporters in cancer: TRPM7, a novel signature in tumour development. *Magn Res* **26**, 149–155.
- Nasulewicz A, Wietrzyk J, Wolf FI, Dzimira S, Madej J, Maier JA, Rayssiguier Y, Mazur A, and Opolski A (2004). Magnesium deficiency inhibits primary tumor growth but favors metastasis in mice. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 26–32.
- Castiglioni S, Cazzaniga A, Trapani V, Cappadone C, Farruggia G, Merolle L, Wolf FI, Iotti S, and Maier JA (2015). Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci Rep* **5**, 16538.
- Chandra S, Parker DJ, Barth RF, and Pannullo SC (2016). Quantitative imaging of magnesium distribution at single-cell resolution in brain tumors and infiltrating tumor cells with secondary ion mass spectrometry (SIMS). *J Neurooncol* **127**, 33–41.
- Donet M, Brassart-Pasco S, Salesse S, Maquart FX, and Brassart B (2014). Elastin peptides regulate HT-1080 fibrosarcoma cell migration and invasion through an Hsp90-dependent mechanism. *Br J Cancer* **111**, 139–148.
- Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, and Giles FJ (2009). Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* **100**, 1523–1529.
- Barrott JJ and Haystead TA (2013). Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J* **280**, 1381–1396.

- [41] Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, Tong M, Chang G, and Luo Y (2009). The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21288–21293.
- [42] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, and Beste G, et al (2004). Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* **6**, 507–514.
- [43] Sims JD, McCready J, and Jay DG (2011). Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* **6**, e18848.
- [44] McCready J, Sims JD, Chan D, and Jay DG (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* **10**, 294.
- [45] Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, and Duffy MJ (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* **72**, 1–22.
- [46] Gorantla B, Asuthkar S, Rao JS, Patel J, and Gondi CS (2011). Suppression of the uPAR-uPA system retards angiogenesis, invasion, and in vivo tumor development in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res* **9**, 377–389.
- [47] Garnier C, Barbier P, Devred F, Rivas G, and Peyrot V (2002). Hydrodynamic properties and quaternary structure of the 90 kDa heat-shock protein: effects of divalent cations. *Biochemistry* **41**, 11770–11778.
- [48] Yang J, Song X, Chen Y, Lu XA, Fu Y, and Luo Y (2014). PLCgamma1-PKCgamma signaling-mediated Hsp90alpha plasma membrane translocation facilitates tumor metastasis. *Traffic* **15**, 861–878.
- [49] Lu XA, Wang X, Zhuo W, Jia L, Jiang Y, Fu Y, and Luo Y (2014). The regulatory mechanism of a client kinase controlling its own release from Hsp90 chaperone machinery through phosphorylation. *Biochem J* **457**, 171–183.
- [50] Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, Tomizawa K, Matsui H, Chait BT, and Cahalan MD, et al (2005). Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem* **280**, 20793–20803.
- [51] Ryazanova LV, Dorovkov MV, Ansari A, and Ryazanov AG (2004). Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* **279**, 3708–3716.
- [52] Ottaviano AJ, Sun L, Ananthanarayanan V, and Munshi HG (2006). Extracellular matrix-mediated membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1. *Cancer Res* **66**, 7032–7040.

2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Nous avons démontré que TRPM7 régule l'invasion *via* sa fonction canalaire. Plus précisément, il régule l'influx magnésique qui est corrélé à une augmentation de la sécrétion de la MMP-2 et de l'invasion. Ce canal possède une particularité, comparé aux autres canaux ioniques, qui est de posséder un domaine kinase fonctionnel à son extrémité carboxylique. Cette kinase est impliquée dans les mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Guilbert et al., 2013, Middelbeek et al., 2012). Nous émettons l'hypothèse que la kinase de TRPM7 aurait également un rôle dans l'invasion des cellules d'ACP.

Nous avons démontré également que TRPM7 est requis pour la sécrétion d'Hsp90 α qui va permettre la stabilisation et l'activation d'uPA et MMP-2. Le mécanisme de régulation de la sécrétion d'Hsp90 α n'est pas connu dans les cellules cancéreuses d'ACP. Hsp90 ne présente pas les caractéristiques des protéines sécrétées classiquement et sa sécrétion est résistante au breféldine A, un inhibiteur des voies classiques de sécrétion (Li et al., 2012, Nickel, 2003). L'ajout de modifications post-traductionnelles permet de réguler la sécrétion de Hsp90 α . Les phosphorylations des résidus thréonine permettent une localisation extracellulaire préférentielle d'Hsp90 α dans les carcinomes et dans un modèle de cellules endothéliales aortiques soumises à un stress hyperglycémique (Quanz et al. 2012, Lei et al. 2007). La kinase de TRPM7 est une sérine / thréonine kinase dont les substrats connus sont limités et sont majoritairement des protéines du cytosquelette ou des enzymes. La kinase pourrait donc potentiellement phosphoryler Hsp90 et réguler sa sécrétion.

Les cations divalents, et plus particulièrement le Mg²⁺, régule la conformation d'Hsp90 en oligomères qui lui permettrait d'augmenter sa capacité d'interaction avec ses co-chaperonnes ou des protéines cibles (Moullintraffort et al., 2010). Ce cation est également connu pour stimuler l'activité kinase de TRPM7.

Les expériences complémentaires ont été réalisées dans le but d'élucider les mécanismes liant la kinase de TRPM7, Hsp90 α et le Mg²⁺ dans l'invasion des cellules d'ACP. Pour réaliser ces expériences, nous utilisons la lignée cellulaire MIA PaCa-2 capable de former des métastases *in vivo*. C'est donc un bon modèle pour étudier l'invasion. La lignée cellulaire

cancéreuse pancréatique PANC-1 invasive non métastatique *in vivo* est également utilisée pour étudier l'expression de nos différentes protéines d'intérêt. En parallèle, un modèle de cellule épithéliale non-cancéreuse pancréatique hTERT-HPNE est utilisé pour démontrer si les mécanismes sont spécifiques aux cellules tumorales.

2.1. TRPM7 et Hsp90α sont surexprimés dans les cellules d'ACP

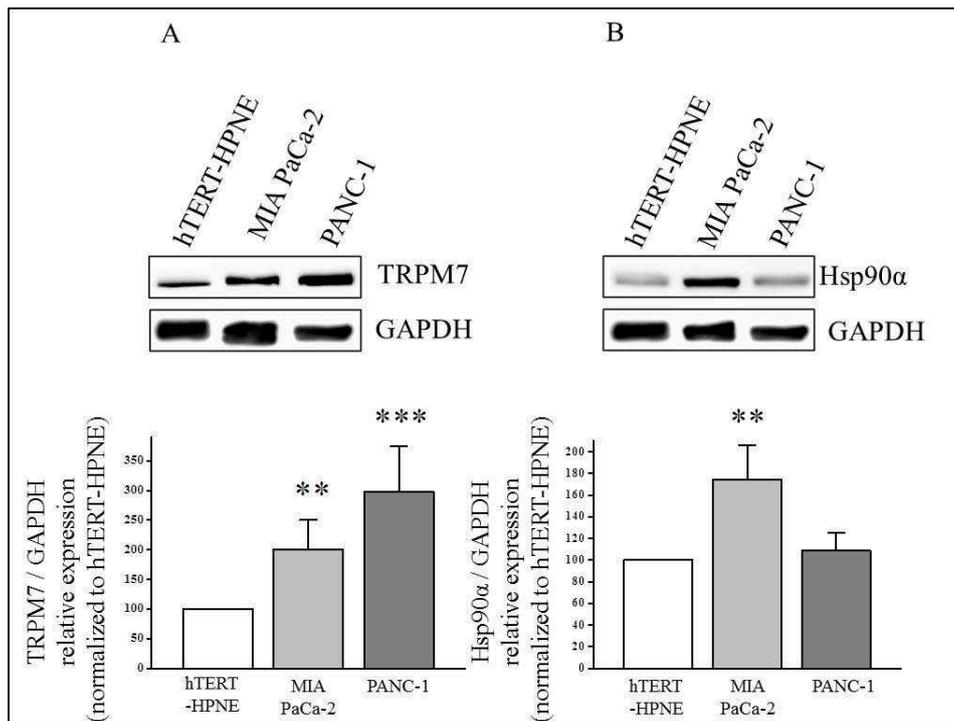


Figure 40 : Expression de TRPM7 de Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques. L'expression de TRPM7 (A, N=3, **p<0,01 et *** p<0,001) et de Hsp90α (B, N=3, **p<0,01) sont analysés en Western Blot sur 50 µg de protéines en rapportant l'expression sur le gène de référence GAPDH dans deux lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques MIA PaCa-2 et PANC-1 comparées à une lignée cellulaire pancréatique non-cancéreuse hTERT-HPNE.

TRPM7 est surexprimé dans les cellules cancéreuses pancréatiques MIA PaCa-2 et PANC-1 comparées aux cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE (Figure 40A, N=3, p<0,01 et p<0,001 respectivement).

Hsp90α est surexprimé seulement dans les cellules MIA PaCa-2 comparée aux cellules hTERT-HPNE (Figure 40B, N=3, p<0,01). Il n'y a pas de différence significative entre la lignée cancéreuse PANC-1 et non cancéreuse hTERT-HPNE (Figure 40B, N=3).

TRPM7 est surexprimé dans les modèles cellulaires d'ACP. Hsp90α est surexprimé seulement dans la lignée ayant une capacité métastatique *in vivo*.

2.2. TRPM7 et Hsp90α ne se régulent pas mutuellement au niveau protéique

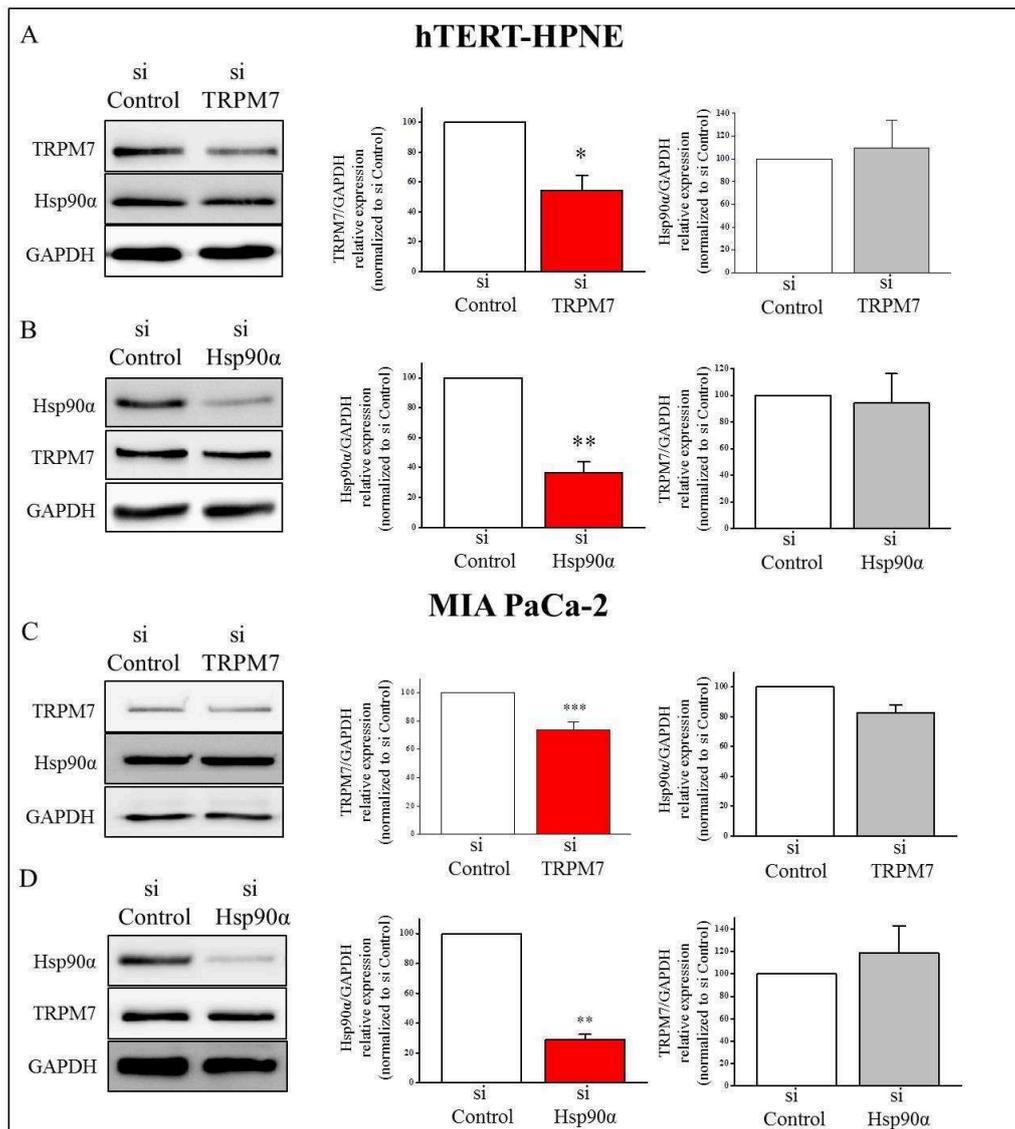


Figure 41 : Effets des extinctions par siRNA sur l'expression protéique de TRPM7 et Hsp90α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques. L'expression de TRPM7 et Hsp90α sont analysés en Western Blot sur 50 µg de protéines en rapportant l'expression sur le gène de référence GAPDH dans les lignées cellulaires pancréatiques non-cancéreuse hTERT-HPNE (A, N=3, *p<0,05 et B, N=3, **p<0,01) et cancéreuse MIA PaCa-2 (C, N=5, ***p<0,001 et D, N=3, **p<0,01).

La transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre TRPM7 diminue l'expression protéique de TRPM7 (Figure 41A, N=3, p<0,05 pour hTERT-HPNE / C, N=5, p<0,001 pour MIA PaCa-2) et ne modifie pas l'expression d'Hsp90α.

La transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre Hsp90α diminue l'expression protéique d'Hsp90α (Figure 41B, N=3, p<0,01 pour hTERT-HPNE / D, N=3, p<0,01 pour MIA PaCa-2) et ne modifie pas l'expression de TRPM7.

Les transfections des cellules sont validées et nos deux acteurs ne se régulent pas mutuellement au niveau protéique.

2.3. La kinase de TRPM7 est impliquée dans l'invasion des cellules d'ACP

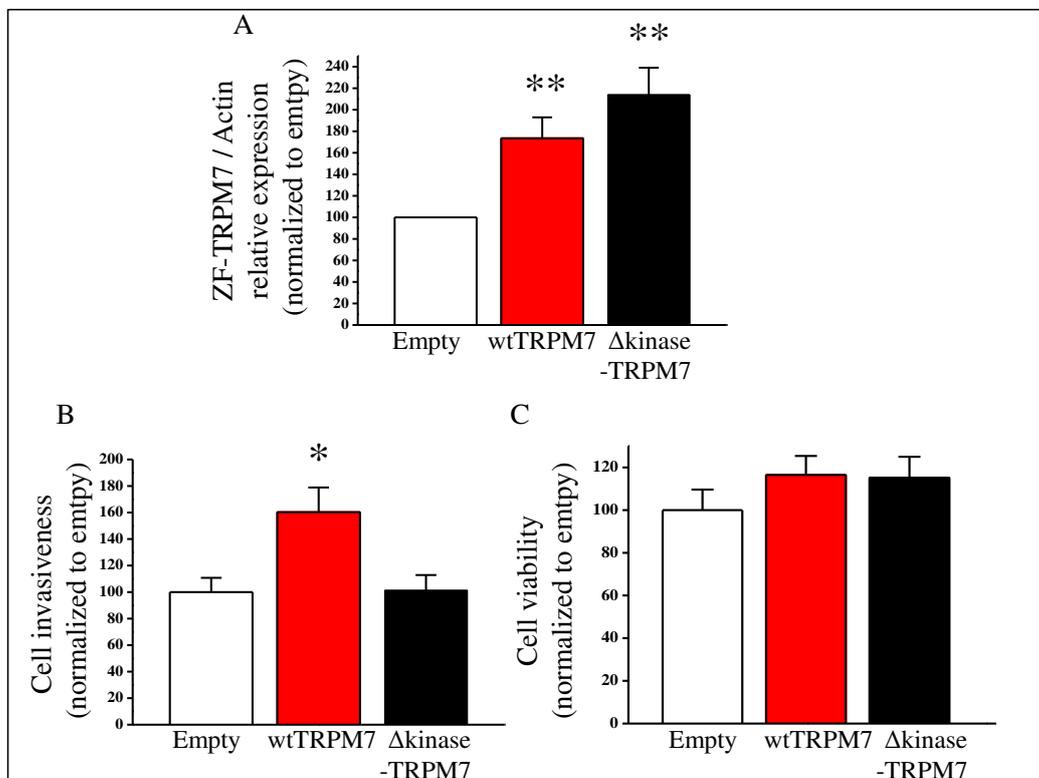


Figure 42 : Rôle de la kinase du canal TRPM7 dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. A. La surexpression de TRPM7 est évaluée par RT-qPCR 48 heures après transfection dans les cellules MIA PaCa-2 (N=3, ** p<0,05). B. L'invasion cellulaire a été mesurée sur 24 heures en chambres de Boyden modifiées recouvertes de 100 µg/mL de Matrigel. 40 000 cellules par inserts sontensemencées (N=3,* p<0,05). C. En parallèle du test d'invasion cellulaire, la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT (N=3).

Les transfections de TRPM7 de zebra fish (sauvage (Wild type-wt) ou sans le domaine kinase (Δ kinase) entraînent une augmentation des transcrits (Figure 42A, N=3, p<0,05). La surexpression de TRPM7 wt augmente l'invasion basale de $60,28 \pm 18,60\%$ comparées aux cellules transfectées avec un vecteur vide (Figure 42A, N=3, p<0,05). L'expression de la forme délétée du domaine kinase n'entraîne pas d'augmentation de l'invasion cellulaire (Figure 42B, N=3).

Les surexpressions de TRPM7 n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire (Figure 42C, N=3).

Ces résultats montrent que la kinase de TRPM7 régule l'invasion cellulaire dans les cellules d'ACP.

2.4. TRPM7 est impliqué dans l'acquisition du phénotype invasif dans les cellules non-cancéreuses pancréatiques

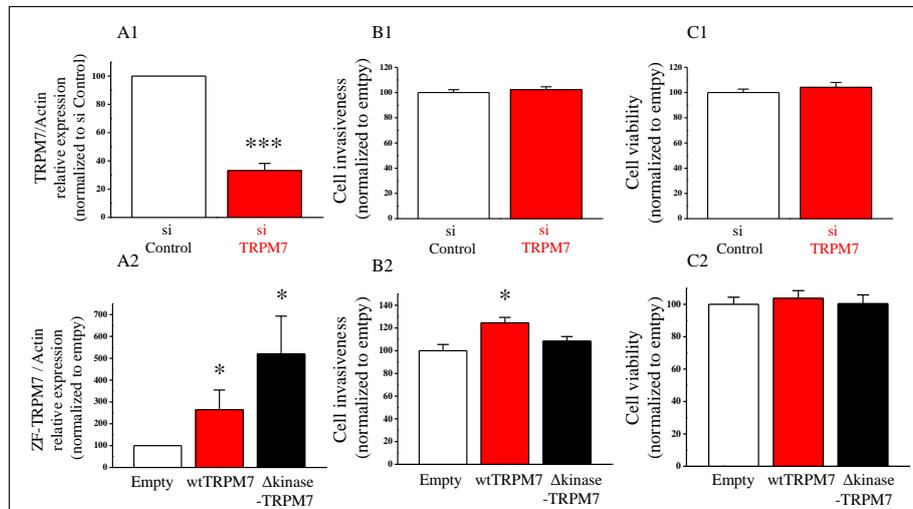


Figure 43 : Rôle de TRPM7 dans l'invasion des cellules non-cancéreuses pancréatiques. A1. L'expression de TRPM7 est évaluée par RT-qPCR 48 heures après transfection (N=4, ***p<0,001). A2. La surexpression de TRPM7 est évaluée par RT-qPCR 48 heures après transfection (N=4, *p<0,05). B. L'invasion cellulaire (20 000 cellules par inserts) a été mesurée sur 24 heures en chambres de Boyden modifiées recouvertes de 100 µg/mL de Matrigel (N=3, *p<0,05) sur des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre TRPM7 (1) ou avec les plasmides de surexpression de TRPM7 (2). C1 et 2. En parallèle du test d'invasion cellulaire, la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT (N=3).

La diminution d'expression de TRPM7, validée en RT-qPCR (Figure 43A1, N=4, p<0,001), n'a aucun effet sur l'invasion des cellules hTERT-HPNE non-cancéreuses (Figure 43B1, N=3).

Les transfections de TRPM7 de zebra fish (sauvage (Wild type-wt) ou sans le domaine kinase (delta kinase) entraînent une augmentation des transcrits (Figure 43A2, N=3, p<0,05). La surexpression de wtTRPM7 augmente l'invasion basale de 24,48±4,84% dans les cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE (Figure 43B2, N=3, p<0,05) comparées aux cellules transfectées avec un vecteur vide. L'expression de la forme délétée du domaine kinase n'entraîne pas d'augmentation de l'invasion cellulaire (Figure 43B2, N=3).

Les transfections n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire (Figure 43C1 et 2, N=3).

Ces résultats prouvent que TRPM7 n'est pas impliqué dans l'invasion basale des cellules pancréatiques non-cancéreuses. Les modèles de surexpression montrent l'implication de TRPM7 et plus particulièrement de son domaine kinase dans l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules non-cancéreuses pancréatiques.

2.5. Hsp90 α module l'invasion des cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques

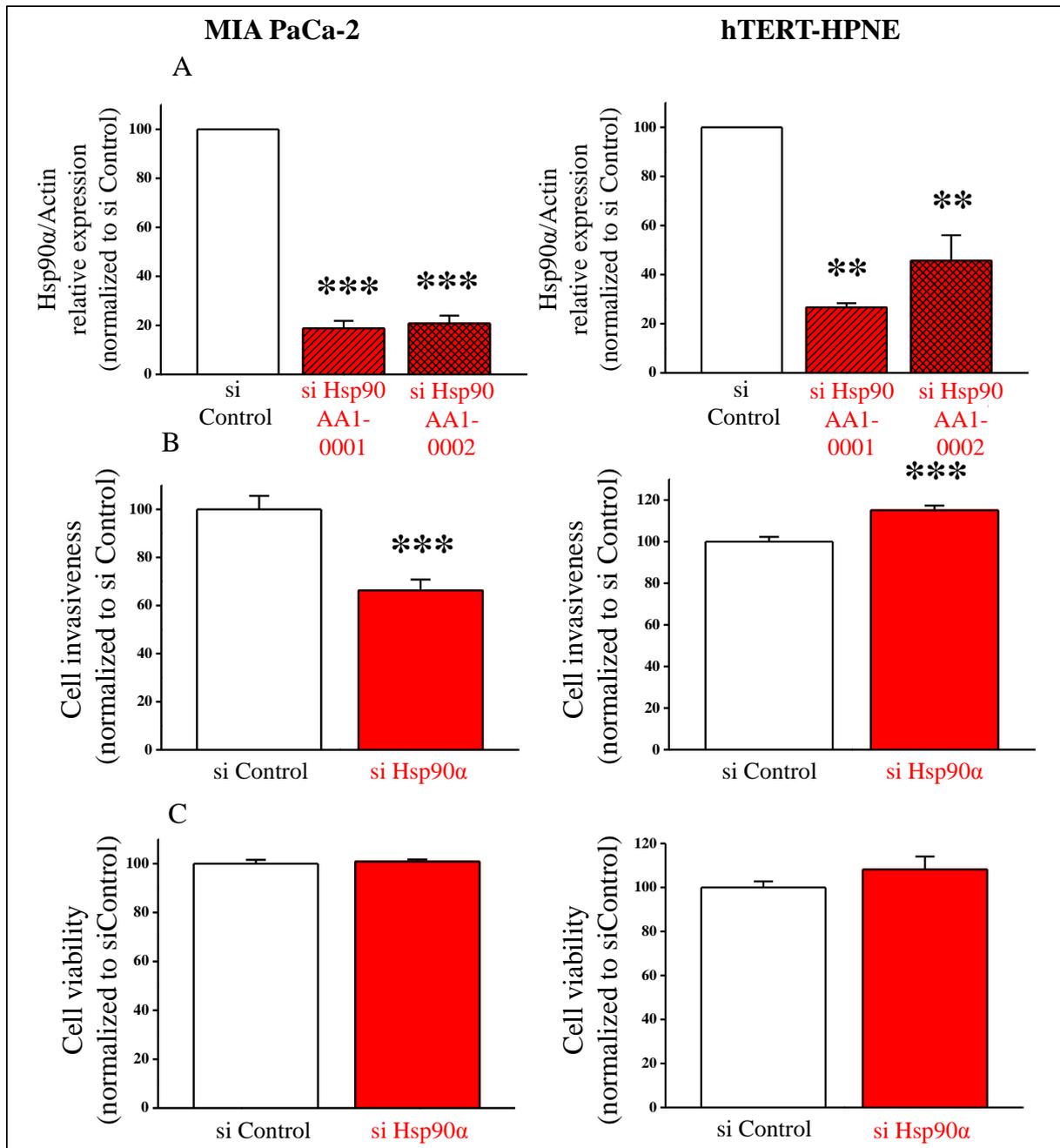


Figure 44 : Rôle d'Hsp90 α dans l'invasion cellulaire. A. L'expression des deux transcrits d'Hsp90 α est évaluée par RT-qPCR 48 heures après transfection (N=3, *** p<0,001 pour MIA PaCa-2 et ** p<0,01 pour hTERT-HPNE). B. L'invasion cellulaire a été mesurée sur 24 heures en chambres de Boyden modifiées recouvertes de 100 μ g/mL de Matrigel. 40 000 cellules par inserts sontensemencées pour MIA PaCa-2 (N=3, ***p<0,001) et 20 000 cellules pour hTERT-HPNE (N=3, ***p<0,001). C. En parallèle du test d'invasion cellulaire, la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT (N=3).

La transfection des siRNA ciblant les deux transcrits d'Hsp90α entraîne la diminution des ARN messagers codant Hsp90α (Figure 44A, N=3, p<0,05).

L'extinction de l'expression d'Hsp90α diminue l'invasion des cellules MIA PaCa-2 de 33,74±4,52%, (Figure 44B, N=3, p<0,001). Dans les cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE, l'invasion basale augmente de 15,10±2,24% (Figure 44B, N=3, p<0,001).

L'extinction d'Hsp90α ne modifie pas la viabilité cellulaire (Figure 44C, N=3).

Hsp90α est impliqué dans l'invasion dans un modèle d'ACP. Les résultats divergents entre le modèle cancéreux et non-cancéreux peuvent laisser suggérer une implication différente d'Hsp90α dans chaque lignée.

2.6. TRPM7 et Hsp90α diminuent l'invasion en intervenant dans une même voie

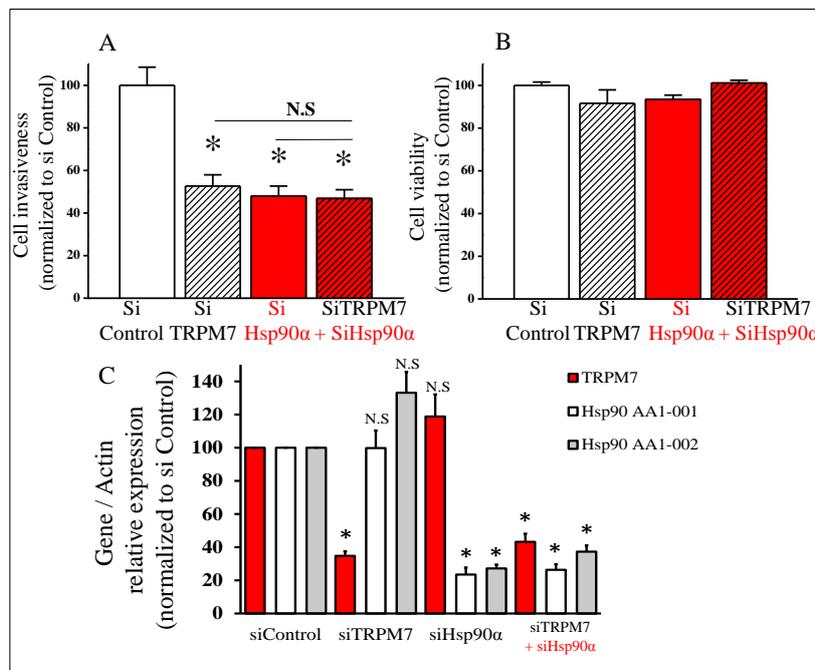


Figure 45 : TRPM7 et Hsp90α régulent l'invasion par une voie commune dans les cellules d'ACP. A. L'invasion cellulaire a été mesurée sur 24 heures en chambres de Boyden modifiées recouvertes de 100 µg/mL de Matrigel. 40 000 cellules par inserts sont ensemencées (N=3, *p<0,05). B. En parallèle du test d'invasion cellulaire, la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT (N=3) C. Le taux des ARNm de TRPM7 et Hsp90α sont mesurés par RT-qPCR dans les cellules transfectées avec un seul siRNA ou en combinaison (N=3, *p<0,05).

L'extinction de TRPM7 et d'Hsp90α diminue l'invasion dans la lignée MIA PaCa-2 (47,34±5,30% et 52,06±4,75% respectivement) comparée aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (100±8,52%) (Figure 45A, N=3, p<0,05). L'extinction de TRPM7 et d'Hsp90α

combinée n'entraîne pas d'effet additif sur l'invasion cellulaire ($53,14 \pm 4,08\%$, Figure 45A, $N=3$, $p < 0,05$).

Les transfections ne modifient pas la viabilité cellulaire (Figure 45B, $N=3$).

L'extinction de TRPM7 ne pas modifie l'expression des deux transcrits d'Hsp90 α . L'expression de TRPM7 n'est pas modifiée suite à l'extinction d'Hsp90 α . L'utilisation des deux siRNA combinés entraîne bien l'extinction des deux gènes (Figure 45C, $N=3$, $p < 0,05$).

Ces résultats montrent que TRPM7 et Hsp90 α régulent l'invasion cellulaire par une voie commune. L'extinction de TRPM7 n'entraîne pas de variations des transcrits d'Hsp90 α et il en est de même pour l'extinction d'Hsp90 α sur les transcrits de TRPM7. TRPM7 et Hsp90 α ne se régulent pas mutuellement au niveau transcriptionnel.

2.7. TRPM7 et Hsp90 α interagissent ensemble au sein d'un même complexe protéique

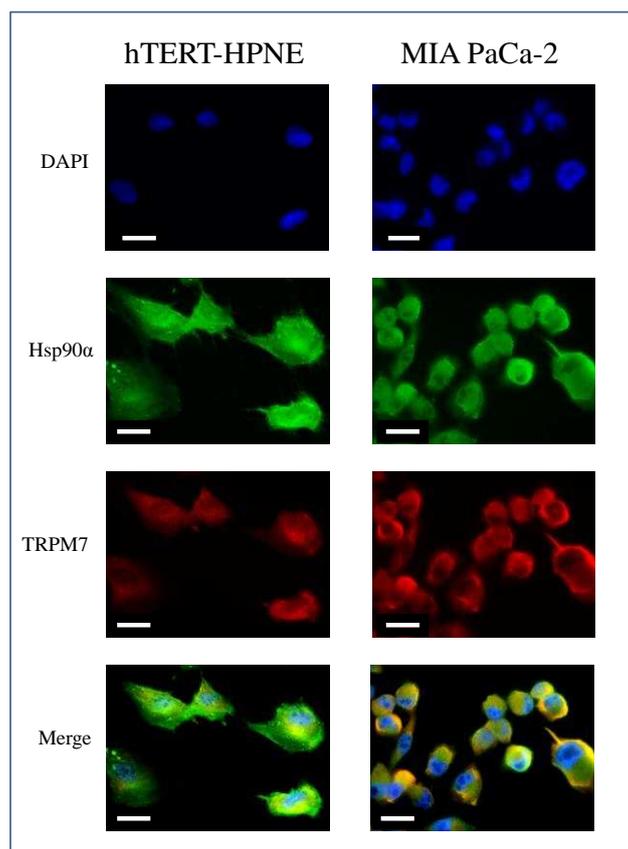


Figure 46 : Localisation de TRPM7 et Hsp90 α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques. Le co-marquage de TRPM7 et d'Hsp90 α est effectué dans les cellules cancéreuses pancréatiques MIA PaCa-2 et épithéliale non-cancéreuse hTERT-HPNE. La barre correspond à 20 μm ($N=3$).

Les expériences d'immunofluorescence montrent l'expression de TRPM7 et Hsp90 α dans la lignée épithéliale non-cancéreuse pancréatique hTERT-HPNE et la lignée cellulaire pancréatique cancéreuse MIA PaCa-2 (Figure 46, N=3). Les co-marquages semblent avoir une localisation différente dans les deux modèles.

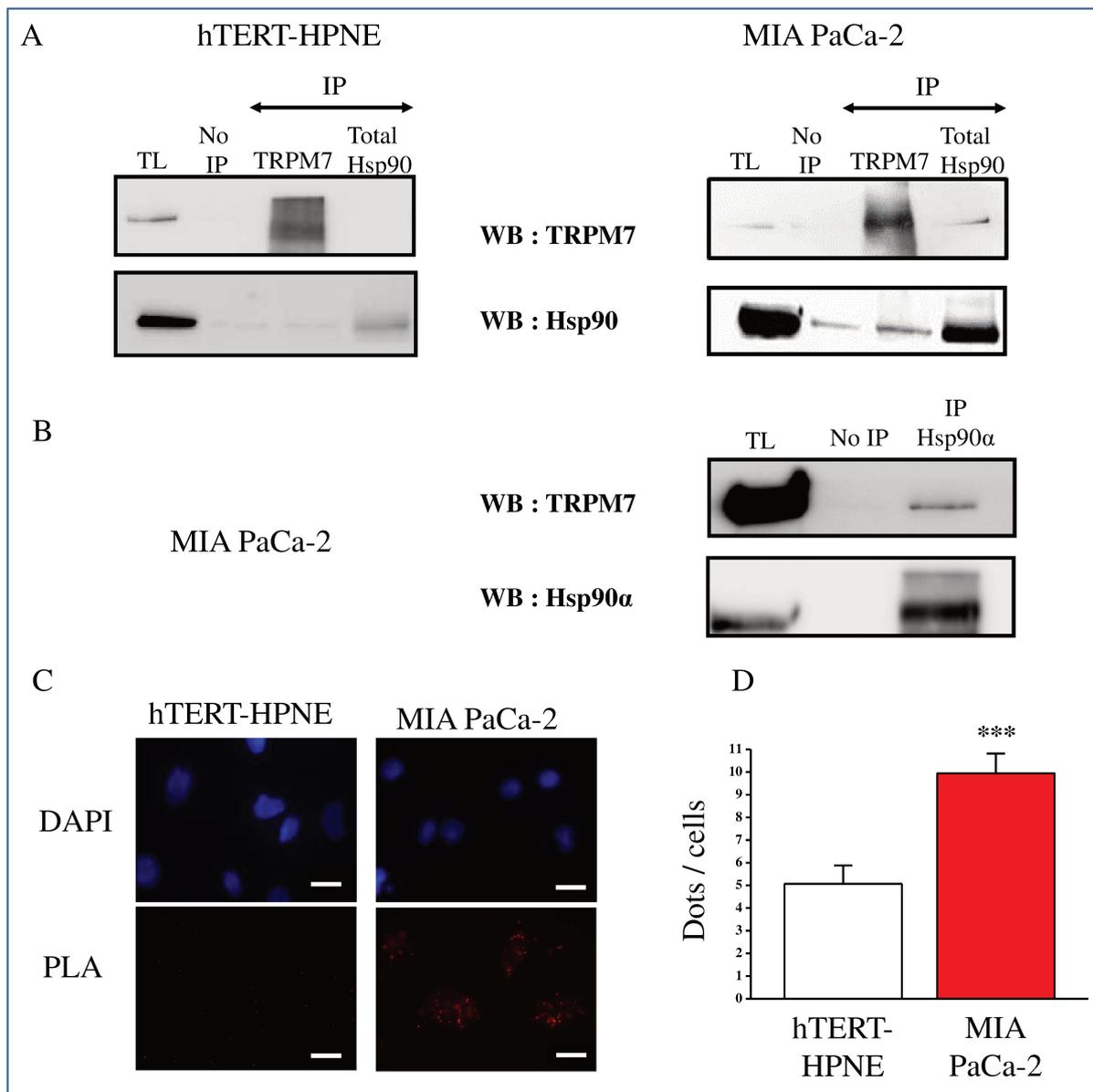


Figure 47 : Interaction entre TRPM7 et Hsp90 α dans les cellules cancéreuses et non-cancéreuses pancréatiques. A. Les immunoprécipitations dirigées contre TRPM7 et Hsp90 total sont réalisées sur 1 mg de protéines. Le lysat total (TL) contient 50 μ g de protéines. Le no IP est le contrôle négatif de l'expérience (sans ajout d'anticorps immunoprécipitants). Les membranes sont révélées en Western Blot avec des anticorps dirigés contre TRPM7 et Hsp90 total (N=3). B. L'immunoprécipitation ciblant Hsp90 α est réalisée sur 1 mg de protéines extraites des cellules MIA PaCa-2 (N=3). C. L'expérience de PLA utilise des anticorps secondaires dirigés contre TRPM7 et Hsp90 α . Les points de co-localisation sont représentés par un signal fluorescent rouge. D. Le nombre de point de co-localisation est quantifié dans les cellules hTERT-HPNE et MIA PaCa-2 (N=2, ***p<0,001).

L'interaction physique entre Hsp90 total et TRPM7 est étudiée par immunoprécipitation. Les deux protéines n'interagissent pas dans un modèle de cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE, contrairement aux cellules cancéreuses MIA PaCa-2 (Figure 47A, N=3). Plus précisément, TRPM7 interagit avec la forme α d'Hsp90 dans les cellules cancéreuses (Figure 47B, N=3). L'expérience de PLA permet de détecter les interactions directes entre deux protéines (espacées de moins de 40 nm). Le nombre de points d'interactions par cellules cancéreuses est plus élevé comparé aux cellules non-cancéreuses : $9,94 \pm 0,87$ points par cellules versus $5,06 \pm 0,80$ (Figure 47C et D, N=2, $p < 0,001$).

Ces différentes techniques permettent de démontrer que TRPM7 et Hsp90 α interagissent directement dans les cellules cancéreuses pancréatiques.

2.8. TRPM7 est impliqué dans la modification post-traductionnelle d'Hsp90 α sur ses résidus sérines

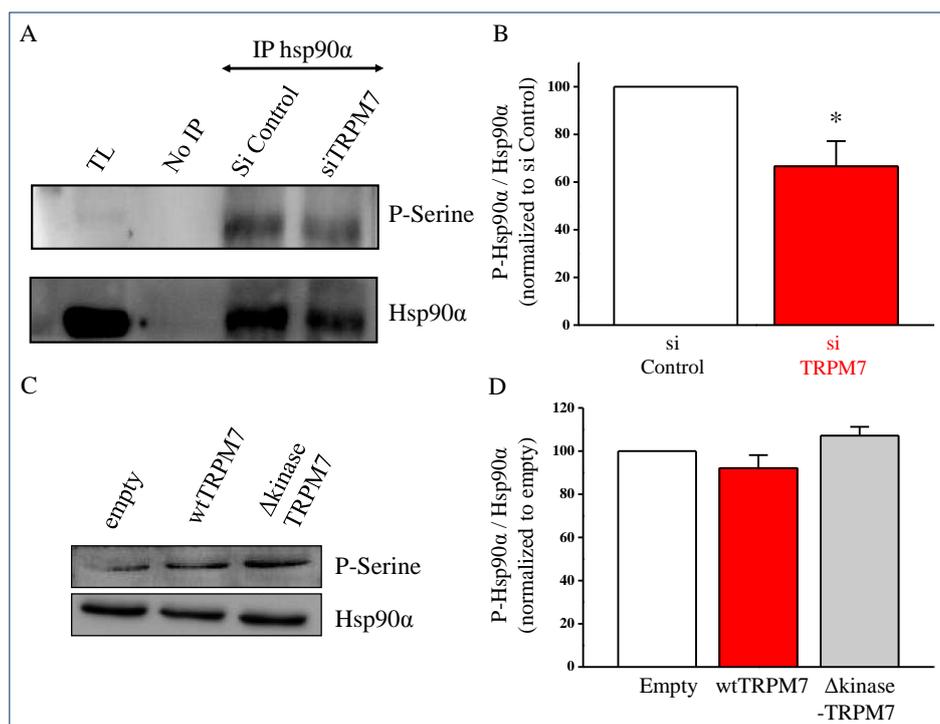


Figure 48 : Implication de TRPM7 dans la phosphorylation d'Hsp90 α sur ses résidus sérine dans les cellules d'ACP. A. Les immunoprécipitations dirigées contre Hsp90 α sont réalisées sur 1 mg de protéines dans les cellules transfectées avec un siRNA contrôle et ciblant TRPM7. Le lysat total (TL) contient 50 μ g de protéines. Le no IP est le contrôle négatif de l'expérience (sans ajout d'anticorps immunoprécipitants). Les membranes sont révélées en Western Blot avec des anticorps dirigés contre les résidus sérines phosphorylées et Hsp90 α . B. La quantification de l'expression relative de la forme phosphorylée d'Hsp90 α rapportée sur sa forme totale est réalisée grâce au Logiciel Quantity One (Biorad) (* $p < 0,05$; N=4). C. Les échantillons (50 μ g de protéines) sont extraits à partir des cellules contrôles transfectées avec un plasmide vide ou les cellules surexprimant TRPM7 sauvage ou délété du domaine

kinase. Les membranes sont révélées en Western Blot avec un anticorps dirigé contre les sérines phosphorylées puis déshybridées pour être incubées avec un anticorps anti-Hsp90 α . D. La quantification de l'expression relative de la forme phosphorylée d'Hsp90 α rapportée sur sa forme totale est réalisée grâce au Logiciel Quantity One (Biorad) (N=3).

Dans les cellules MIA PaCa-2 transfectées avec un siRNA dirigé contre TRPM7, la phosphorylation d'Hsp90 α sur les résidus sérines diminue de $33,39 \pm 10,60\%$ (Figure 48A et B, N=4, $p < 0,05$).

La surexpression de TRPM7 sauvage ou délété du domaine kinase n'entraîne pas de modification de la phosphorylation d'Hsp90 α sur ses résidus sérines (Figure 48C et D, N=4).

TRPM7 est impliquée dans la phosphorylation d'Hsp90 α sur ses résidus sérine probablement *via* son domaine kinase de manière indirecte.

2.9. Rôle de la kinase dans la localisation du complexe TRPM7-Hsp90 α

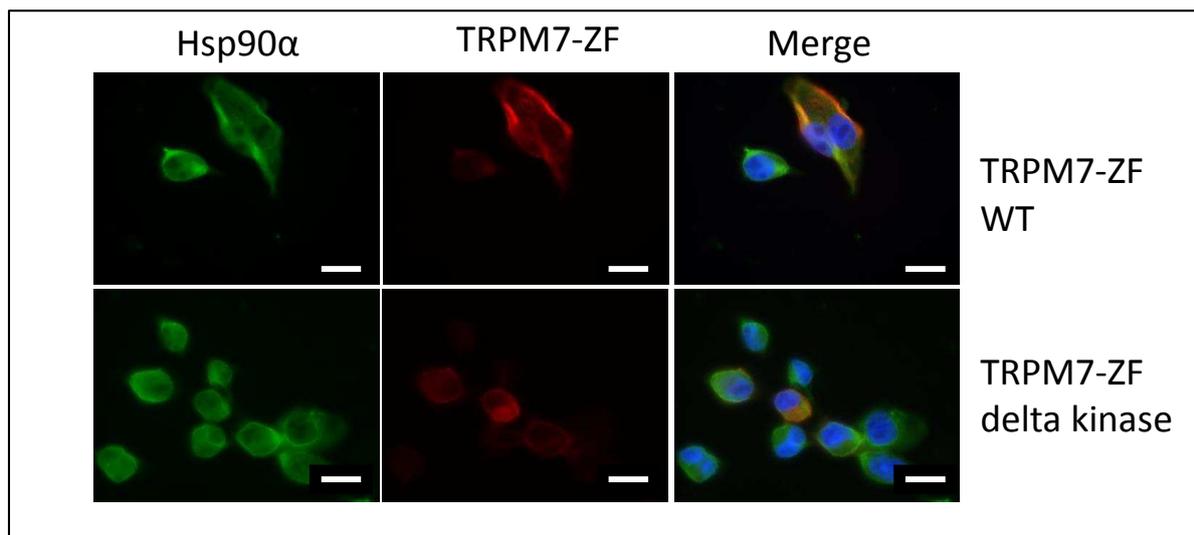


Figure 49 : Implication du domaine kinase dans la localisation de TRPM7 et Hsp90 α dans les cellules d'ACP. Le co-marquage de TRPM7 ZF (zebra fish) et d'Hsp90 α est effectué dans les cellules cancéreuses pancréatiques MIA PaCa-2 surexprimant soit la forme sauvage (TRPM7-ZF WT) ou délété du domaine kinase (TRPM7-ZF delta kinase). La barre correspond à 20 μm (N=2).

La localisation de la superposition des marquages correspondant à TRPM7 et Hsp90 α est différente si l'on compare les cellules surexprimant la forme sauvage de TRPM7 et délété du domaine kinase (Figure 49, N=2).

Ces résultats suggèrent un rôle de la kinase dans la localisation du complexe dans les cellules MIA PaCa-2

2.10. Le Mg^{2+} est impliqué dans la régulation de l'invasion via la voie impliquant TRPM7 et Hsp90 α

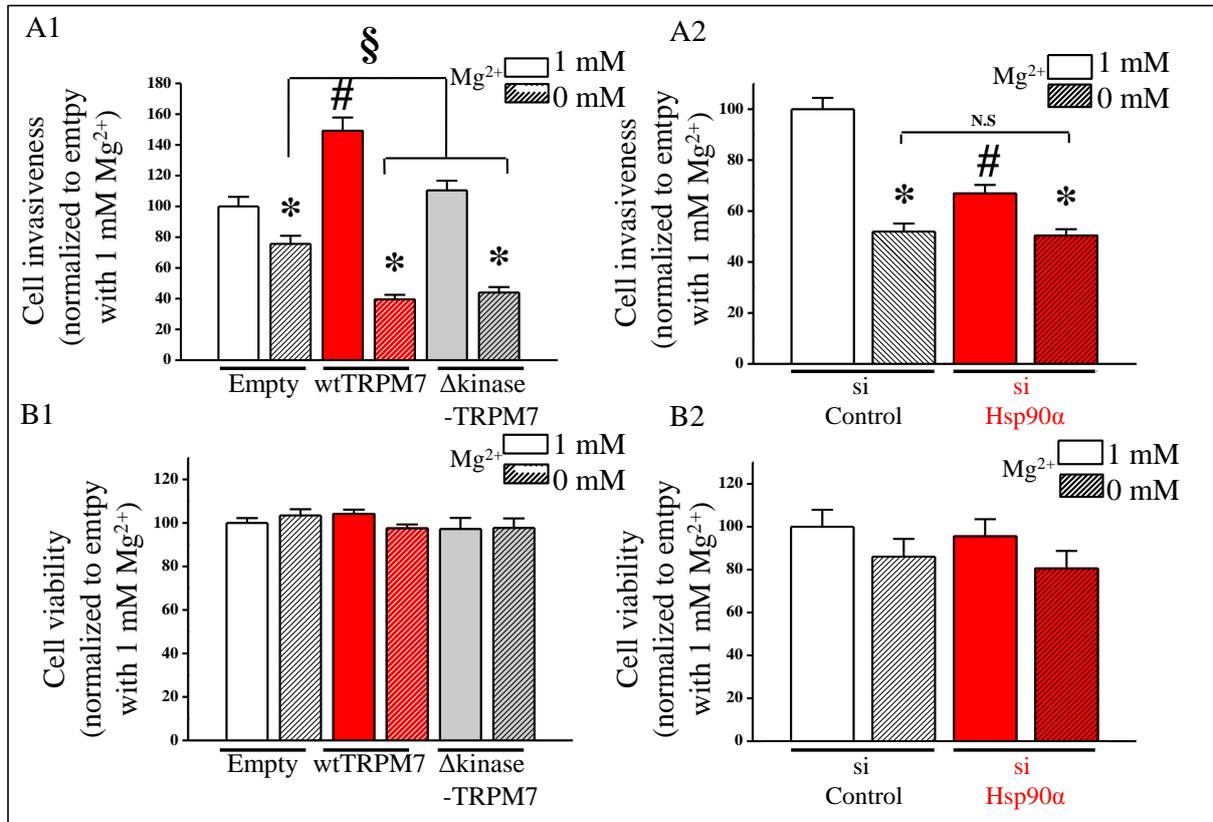


Figure 50 : Rôle du Mg^{2+} dans l'invasion régulée par la kinase de TRPM7 et Hsp90 α dans les cellules d'ACP. L'invasion basale est mesurée sur 24 heures en présence ou en absence d'une concentration de Mg^{2+} extracellulaire physiologique (1 mM Mg^{2+}) pour les cellules MIA PaCa-2. Les cellules sont transfectées soit avec les formes sauvages et mutées de TRPM7 (A1) ou avec des siRNA dirigés contre Hsp90 α (A2 ; N=3, * p <0,05). B. La viabilité en parallèle de ces expériences est mesurée par le test MTT (B1 et B2 ; N=3).

L'invasion cellulaire a été évaluée en présence ou en absence d'une concentration en Mg^{2+} physiologique pour les cellules MIA PaCa-2, dans lesquelles TRPM7 sauvage ou sans domaine kinase est surexprimé (Figure 50A1, N=3, p <0,05). L'absence de Mg^{2+} extracellulaire diminue l'invasion cellulaire de $24,40 \pm 5,29\%$. La surexpression de TRPM7 sauvage augmente l'invasion de $49,21 \pm 8,64\%$. Lorsque l'on surexprime TRPM7 sauvage en l'absence de Mg^{2+} extracellulaire, l'invasion diminue très fortement de $60,49 \pm 2,99\%$. Ces résultats démontrent que la régulation de l'invasion *via* TRPM7 est fortement dépendante du Mg^{2+} .

Il y a un effet additif, en absence Mg^{2+} extracellulaire, lorsque l'on surexprime TRPM7 comparé aux cellules exprimant un vecteur vide, ce qui montre que le Mg^{2+} régule l'invasion par d'autres voies que *via* TRPM7. Néanmoins, lorsque l'on compare, en absence de Mg^{2+}

extracellulaire, les effets de la surexpression de TRPM7 sauvage ou sans le domaine kinase, l'effet observé similaire montre que le domaine kinase et le Mg^{2+} contrôle l'invasion *via* une même voie (Figure 50A1, N=3, n=80, $p < 0,05$).

Le rôle d'Hsp90 α et du Mg^{2+} dans l'invasion cellulaire de la lignée MIA PaCa-2 a été évalué en modifiant la concentration magnésique extracellulaire. Sans Mg^{2+} extracellulaire, l'absence d'effet additif sur l'invasion des cellules transfectées avec un siRNA contrôle ($51,94 \pm 3,15\%$) ou avec des siRNA contre Hsp90 α ($50,40 \pm 2,47\%$) révèle que le Mg^{2+} et Hsp90 α régule l'invasion par une voie commune (Figure 50A2, N=3, $p < 0,05$)

Les transfections et les variations de Mg^{2+} extracellulaire ne modifient pas la viabilité cellulaire (Figure 50B1 et B2, N=3).

2.11. Validation de la stratégie d'inactivation du domaine kinase endogène de TRPM7 par CRISPR cas9

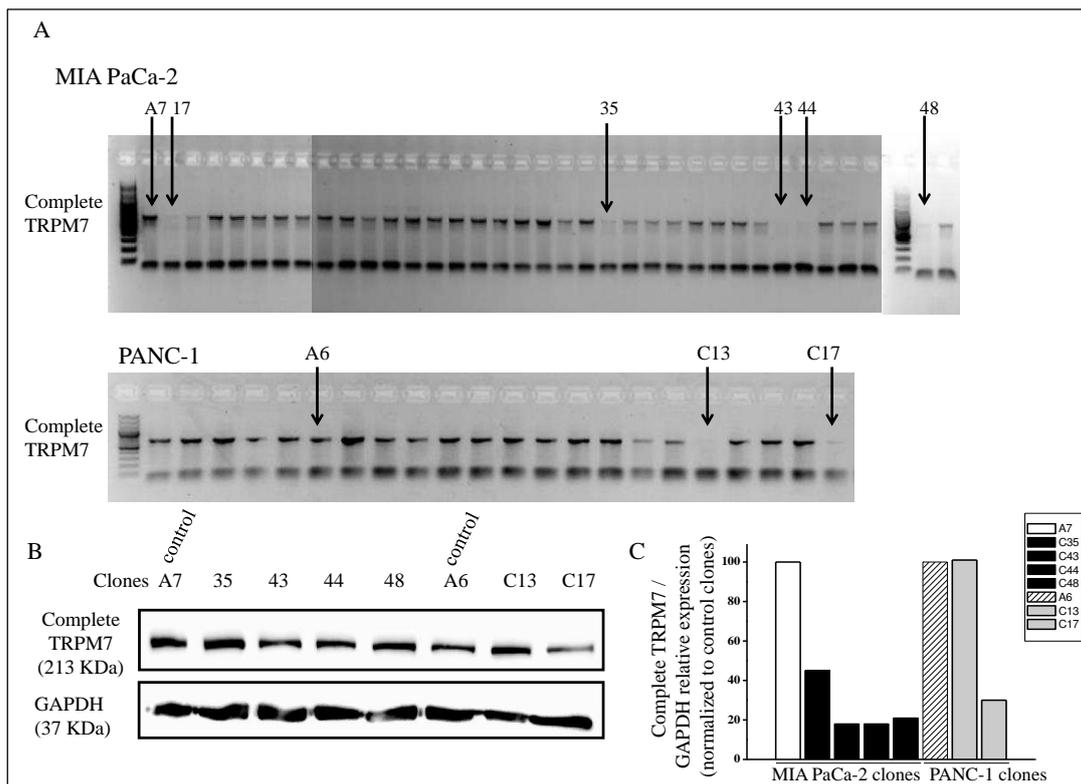


Figure 51 : Expression de TRPM7 sauvage suite à la délétion du domaine kinase endogène de TRPM7 par la technique CRISPR-Cas9 dans les cellules d'ACP. A. Les transcrits de la forme endogène complète de TRPM7 sont détectés grâce à des amorces spécifiques par RT-PCR qualitative dans les lignées MIA PaCa-2 et PANC-1. B. L'expression protéique de la forme complète de TRPM7 est détectée en Western Blot grâce à un anticorps ciblant le domaine kinase de TRPM7 (N=1). C. La quantification de l'expression relative de la forme complète de TRPM7 est réalisée grâce au logiciel Quantity One (BioRad) (N=1).

La stratégie CRISPR-Cas9 a été utilisée pour faire exprimer TRPM7 délété de son domaine kinase dans la cellule. L'expression des transcrits de TRPM7 complet dans les cellules transfectées résistantes à l'antibiotique est évalué par RT-PCR. Les clones A7 et A6 exprimant la forme complète de TRPM7 sont des contrôles négatifs pour les cellules MIA PaCa-2 et PANC-1, respectivement. Une diminution d'expression de la forme complète est observée dans 7 clones (5 pour MIA PaCa-2 et 2 pour PANC-1) (Figure 51A, N=1).

Une diminution de 54 % de l'expression de la protéine complète est observée dans le clone 35. Pour les clones 43, 44 et 48, une diminution de 82, 81 et 78 % est observée. Dans le clone C17, obtenu à partir de la transfection de cellule PANC-1, l'expression de la protéine complète de TRPM7 diminue de 70 % (Figure 51B et C, N=1).

3. TRPM7 REGULE L'INVASION DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES ET PANCREATIQUES NON-CANCEREUSES EXPOSEES AU Cd²⁺

3.1. Résumé

Les individus sont exposés involontairement à de nombreuses substances chimiques dangereuses par le biais de la pollution environnementale. Un parallèle existe entre la pollution environnementale et l'apparition des cancers (BASOL, 2015 ; INSEE, 2012). Les métaux et métalloïdes font partie des principaux polluants retrouvés dans les sols et les eaux souterraines (25 et 22 % respectivement) (BASOL, 2013).

Parmi ces polluants métalliques se trouve le Cd²⁺, un cation classé comme carcinogène probable depuis 1993 par l'IARC. Le Cd²⁺ est un polluant métallique appartenant à la famille des métallo-œstrogènes car il est capable de mimer les effets des œstrogènes en activant les récepteurs hormonaux de type ER α (Brama et al., 2007, Byrne et al., 2013, Johnson et al., 2003). Le Cd²⁺ a la particularité d'avoir une demi-vie très longue (plus de 10 ans). Il va s'accumuler et les effets chroniques observés sont dus à sa bioaccumulation dans l'organisme. Les études épidémiologiques montrent une association entre l'exposition à ce polluant et les cancers du sein et du pancréas (Garcia-Esquinas et al., 2014, Strumylaite et al., 2014). Dans les modèles cellulaires, le Cd²⁺ entraîne la transformation vers un phénotype invasif de cellules épithéliales n'exprimant pas les ER, ce qui montre que son rôle ne passe pas par sa fonction de métallo-œstrogène dans ces modèles. Le Cd²⁺ entraîne la transformation vers phénotype cancéreux de cellules épithéliales mammaires et

pancréatiques MCF 10A et HPDE. Ces cellules vont devenir plus invasives et secrètent plus de MMPs (Benbrahim-Tallaa et al., 2009, Qu et al., 2012). Les MMPs en dégradant la matrice permettent l'invasion cellulaire.

Les canaux ioniques sont nécessaires pour l'absorption des cations métalliques essentiels tels que le Mg^{2+} , le Zn^{2+} ou le Mn^{2+} . Des cations métalliques toxiques tels que le Cd^{2+} traverse la membrane plasmique *via* ces canaux ioniques comme par exemple le canal TRPM7 (Monteilh-Zoller et al., 2003). Dans les cancers du sein et du pancréas, ce canal est identifié comme un biomarqueur et régule l'invasion dans les modèles cellulaires (Middelbeek et al., 2012, Rybarczyk et al., 2017).

Les objectifs de notre étude étaient de démontrer si le traitement chronique au Cd^{2+} modifie l'expression et la fonctionnalité du canal TRPM7 et si ce canal participe à la transformation vers un phénotype invasif des cellules induite par le Cd^{2+} . Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé deux lignées cellulaires humaines non-cancéreuses. La lignée épithéliale mammaire MCF 10A est exposée 40 semaines à 2,5 μM de Cd^{2+} . Le deuxième modèle est la lignée épithéliale pancréatique hTERT-HPNE exposée 29 semaines à 1 μM de Cd^{2+} .

Nous avons démontré que le Cd^{2+} augmente l'expression protéique de TRPM7 dans les deux modèles cellulaires et sa fonctionnalité dans les cellules MCF 10A par la mesure du courant généré en patch-clamp.

TRPM7 est impliqué dans l'augmentation de l'entrée cationique constitutive, mesurée par la technique de quench Mn^{2+} , suite au traitement au Cd^{2+} . Nous nous sommes intéressés ensuite plus particulièrement à la concentration calcique et magnésique cytoplasmique grâce à l'utilisation de sonde spécifique (Fura-2AM et Mag Fura-2AM). Le traitement augmente plus particulièrement la concentration magnésique cytosolique mais aussi calcique. TRPM7 est impliqué dans cette augmentation des concentrations cationiques dans les cellules traitées.

De manière surprenante, dans les cellules MCF10A non traitées, la diminution d'expression de TRPM7 par l'utilisation d'un siRNA augmente faiblement la concentration calcique cytosolique. Dans les cellules hTERT-HPNE, une augmentation de la concentration magnésique cytosolique est observée suite à la transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre TRPM7.

Nous avons remarqué que le traitement au Cd^{2+} entraîne un changement de morphologie des cellules MCF 10A seulement. Les cellules non traitées possèdent une morphologie cubique et sont regroupées en clusters. Les cellules s'individualisent et s'arrondissent suite au traitement, ce qui reflète une transition de cellules en clusters vers amiboïde (CAT). Nous avons ensuite regardé si les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux étaient modifiés dans ces cellules. Nous observons une augmentation des marqueurs mésenchymateux (vimentine et N-cadhérine) couplée à une diminution d'un marqueur épithélial (E-cadhérine). Cette modification de morphologie et la modification d'expression des marqueurs en faveur du phénotype mésenchymateux sont régulées par TRPM7. Ce changement de morphologie est associé à une augmentation de l'invasion et de la migration cellulaire dans les cellules MCF 10A. L'invasion des cellules hTERT-HPNE est également augmentée et régulée par TRPM7. Dans ces cellules, la morphologie et l'expression des marqueurs mésenchymateux ne sont pas modifiées suite au traitement. TRPM7 est impliqué dans la régulation de l'invasion cellulaire dans ces deux modèles.

Cette étude originale décrit le rôle de TRPM7 dans deux modèles non-cancéreux dont l'invasion est stimulée par un polluant environnemental, le Cd^{2+} . L'expression et la fonctionnalité de TRPM7 sont augmentées suite au traitement chronique. TRPM7 est impliqué l'entrée cationique constitutive et l'homéostasie magnésique majoritairement. TRPM7 régule l'invasion et la migration dans les cellules MCF-10A en régulant la transition de cellules en clusters vers un phénotype amiboïde et l'expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux en faveur de l'EMT. L'invasion est également régulée par TRPM7 dans les cellules hTERT-HPNE mais le mécanisme n'est pas élucidé.

3.2. Article 2

Cadmium exposure increases TRPM7 expression in epithelial cells leading to enhanced cell migration and invasion.

Alison Vanlaeys, Grégory Fouquet, Sylvie Pasco-Brassart, Thibaut Lefebvre, Pierre Rybarczyk, Philippe Kischel, Frédéric Hague, Isabelle Dhennin-Duthille, Bertrand Brassart, Halima Ouadid-Ahidouch, and Mathieu Gautier

Cadmium exposure increases TRPM7 expression in epithelial cells leading to enhanced cell migration and invasion.

Alison Vanlaeys¹, Grégory Fouquet¹, Sylvie Pasco-Brassart², Thibaut Lefebvre¹, Pierre Rybarczyk¹, Philippe Kischel¹, Frédéric Hague¹, Isabelle Dhennin-Duthille¹, Bertrand Brassart², Halima Ouadid-Ahidouch¹, and Mathieu Gautier¹✉

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire – EA4667, UFR Sciences, Université de Picardie Jules Verne (UPJV), F-80039 Amiens, France

²UMR CNRS 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC), Université de Reims Champagne Ardenne (URCA), F-51095 Amiens, France

✉Address all correspondence to : Mathieu Gautier, Université de Picardie Jules Verne, F-80039 Amiens, France. ORCID ID: 0000-0001-8971-5683. E-mail: mathieu.gautier@u-picardie.fr

Abstract:

Human non-cancer epithelial cells were chronically exposed to cadmium (Cd) and the expression of TRPM7 was assessed.

Chronic exposure to Cd induced TRPM7 overexpression in both mammary and pancreatic non-cancer epithelial cells. Membrane currents and constitutive cation entry dependent of TRPM7 were also enhanced following Cd exposure leading to Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis unbalance. Cd exposure led to a slight increase of cytosolic Ca^{2+} and a stronger increase of cytosolic Mg^{2+} which are both reverted by TRPM7 silencing.

Interestingly, Cd exposure induced EMT and rounded-shaped morphology in mammary epithelial cells as well as stimulation of cell migration and invasion. TRPM7 silencing abolished these phenotypic cell fates indicating that this channel is a key player of cell migration and invasion in transformed cells.

In conclusion, Cd exposure led to TRPM7 overexpression which regulates invasive phenotype in epithelial cells probably through Mg^{2+} unbalance.

Keywords: cadmium, TRPM7, magnesium, cell invasion, cancer transformation

INTRODUCTION:

Cadmium (Cd) is a metal pollutant which can accumulate in a sustainable way in the body, mainly in the liver and the kidney (Rani et al. 2014). Cd accumulation in tissues is suspected to be linked to breast cancer outcome (Larsson et al. 2015). In vivo studies showed that Cd acts as a metalloestrogen leading to both endometrial and mammary gland hyperplasia and hypertrophy (Johnson et al. 2003). Moreover, Cd stimulates breast cancer cell proliferation through ER alpha activation (Martinez-Campa et al. 2006). However, chronic Cd exposure induces non-cancer epithelial cell transformation into an invasive phenotype independently of estrogen receptors (Qu et al. 2012; Benbrahim-Tallaa et al. 2009). Cd can diffuse across the plasma membrane through several transporters including ion channels (Thevenod 2010). TRPM7 is a Mg^{2+}/Ca^{2+} channel which is permeant to metals including Cd^{2+} (Monteilh-Zoller et al. 2003). TRPM7 is involved Cd uptake and cytotoxicity in human osteoblasts (Martineau et al. 2010). Numerous studies have shown that TRPM7 is involved in cancer progression (Gautier et al. 2016). TRPM7 is overexpressed in breast cancer leading to cell proliferation (Guilbert et al. 2009) and migration enhancement (Guilbert et al. 2013; Middelbeek et al. 2012). In pancreatic ductal adenocarcinoma, TRPM7 expression is inversely correlated to survival (Rybarczyk et al. 2012) and it regulates human pancreatic cancer cell migration and invasion through constitutive Mg^{2+} influx (Rybarczyk et al. 2017).

The aim of this study is to assess how TRPM7 is involved in epithelial cell transformation induced by Cd.

MATERIAL and METHODS:

Cell culture and cadmium treatment.

We used two human non-cancer epithelial cell lines, one from breast (MCF10A) and one from pancreas (hTERT-HPNE). MCF10A were provided by ATCC® (CRL-10317™) and were treated by 2.5 μ M Cd for 40 weeks according to previous published data (Benbrahim-Tallaa et al. 2009). hTERT-HPNE were provided by ATCC® (CRL-4023™) and treated by 1 μ M Cd for 30 weeks (Qu et al. 2012). MCF10A were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco) supplemented with 10% Fetal calf serum (FCS, ThermoFisher), hydrocortisone (50 ng/ml), insulin (0.01 mg/ml), human recombinant EGF (20 ng/ml), and cholera toxin (100 ng/ml). hTERT-HPNE were cultured in base medium: 75% DMEM without glucose (Sigma) and 25% Medium M3 Base (Incell Corp) with 5% FCS. Complete growth medium is supplemented with the following components: human recombinant EGF (10 ng/ml), D-glucose (1g/L), puromycin (750 ng/ml), L-glutamine (0.3 g/L), and sodium bicarbonate (1.5 g/L). Cells were trypsinized once a week using trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and incubated at +37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Small Interference RNA Technique.

siRNAs were included in non-cancer cells by nucleofection using a Nucleofector™ II device (Lonza). MCF10A and hTERT-HPNE cells (10^6 cells) were transfected with 2 μg of siRNA (corresponding to 1.5 μM) according to the optimized protocol recommended by Lonza. Non-cancer cells were nucleofected with siRNA targeting TRPM7 (siTRPM7) or a scrambled siRNA (siControl) as previously described (Rybarczyk et al. 2017). All the experiments were made in the 48 hours following the nucleofection.

Western-Blot.

Cells were lysed 30 minutes on ice in radioimmunoprecipitation assay buffer (1% Triton X-100, 1% Na deoxycholate, 150mM NaCl, 10 mM $\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$, pH 7.2) supplemented with Sigma P8340 inhibitors cocktail, 2 mM EDTA, and 5 mM orthovanadate. After centrifugation at 13,000 rpm, the proteins in the supernatant were quantified using the BCA method (BioRad). Equal amounts of each protein sample (50 μg) were separated by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membrane (Amersham). Blots were incubated with antibodies raised against TRPM7 (1/1000, Abcam), N-Cadherin (1/1000, Abcam), E-Cadherin (1/1000, Abcam), Vimentin (1/250, ThermoFisher) and Tubuline (1/7000, Sigma). Blots were developed with the enhanced chemiluminescence system using specific peroxidase-conjugated anti-IgG secondary antibodies.

Electrophysiological Recordings.

To study ion channel currents, we used conventional technique of patch clamp (Hamill et al. 1981). TRPM7 currents recordings was performed using in the whole-cell configuration as previously described (Rybarczyk et al. 2017). Briefly, holding membrane potential was held to -40 mV, and currents were elicited by a ramp depolarization from -100 mV to +100 mV for 350 milliseconds. Interval between each ramp depolarization was 10 seconds. After the dialysis of intracellular media by 0 Mg intrapipette solution, the MIC current was recorded. To measure MIC current, the difference between the steady-state current activated by the depletion of $[\text{Mg}^{2+}]_i$ and the basal current recorded few minutes after patch rupture was calculated. Currents were expressed as current densities (in pA.pF^{-1}) by dividing the current intensity (in pA) by the cell capacitance (in pF). All experiments were performed at room temperature.

Manganese Quenching and Intracellular Calcium and Magnesium Imaging.

Non-cancer cells were plated on glass coverslips in 35-mm diameter dishes at a density of 3×10^4 and 5×10^4 cells for hTERT-HPNE and MCF10A respectively. After 48 hours, cells were

loaded in cell growth medium at +37°C for different times (35 minutes for hTERT-HPNE and 40 minutes for MCF-10A) with 3 μM Fura 2-AM (Sigma-Aldrich) or 3 μM Mag-Fura 2-AM (Invitrogen) and subsequently washed three times with the extracellular solution. The coverslip was then transferred onto a perfusion chamber on a Zeiss microscope equipped for fluorescence. Manganese (Mn^{2+}) is a cation able to fix Fura 2-AM fluoroprobe and quench its fluorescence (Fasolato et al. 1993). To estimate the divalent cation influx, we used Mn^{2+} quenching protocol as previously described (Rybarczyk et al. 2017). Briefly, cells were perfused for 1 minute with extracellular solution. Then, Ca^{2+} was replaced by 2 Mn^{2+} (2 mM) for 2 minutes. Cells were excited at 360 nm and fluorescence emission was monitored at 510 nm. After Mn^{2+} perfusion, the decrease of Fura-2 fluorescence described a linear decay, and the slope is correlated with the rate of the Mn^{2+} influx. The calculated slope is obtained by subtracting the slope of basal decreasing Fura-2 fluorescence obtained in basal conditions (culture conditions) and after Mn^{2+} application. MCF10A and hTERT-HPNE were incubated with Fura-2AM as previously indicated to measure the Ca^{2+} basal fluorescence ratio. During the perfusion with the extracellular solution containing 2 mM of Ca^{2+} , cells were excited alternatively at 350 nm and 380 nm. The ratio of Fura-2 fluorescence intensities measured with excitation at 350 and 380 nm (F_{350}/F_{380}) was used as a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ related signal. To evaluate Mg^{2+} basal ratio, cells were perfused by extracellular solution which contained 1 mM Mg^{2+} , and MAG-Fura-2AM was used as a fluoroprobe. MAG-Fura-2 fluorescence intensities measured with excitation at 330 and 370 nm (F_{330}/F_{370}) was used as a $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -related signal.

Cell morphology assessment.

After the Cd treatment period, cells were photographed under an inverted microscope (Zeiss) when confluence was moderate. Cells clustering at x200 magnification was evaluated. Circularity index of cells at x400 magnification was calculated by Image J software.

Cell Migration Assays.

The effect of Cd treatment on cellular motility was assessed using scratch test. 30×10^4 cells are embedded in a 35-mm diameter dishes. When the cells have formed a confluent cell monolayer, a linear empty space was generated using sterile plastic pipette tip. The closure is estimated by measuring its area for each time (T0, T12h, T16h, T20h, T24h) using the Image J software. Migration assay used cell culture inserts (BD FALCON Cell Culture Inserts, BD Biosciences) with 8- μm pore size polyethylene terephthalate membrane and protocol is the same of cell invasion assays.

Cell Invasion Assays.

For invasion test, cell culture inserts were coated with Matrigel. The upper compartment was seeded with 2×10^4 cells and 4×10^4 of 24-hour transfected hTERT-HPNE and MCF10A

cells respectively in growth medium supplemented with FCS. The lower compartments were also filled with growth medium supplemented with FCS. Thus, migration and invasion assays were performed without addition of chemoattractant. After 24 hours of incubation at +37°C, inserts were washed by phosphate-buffered saline, fixed 10 minutes by methanol and stained 5 minutes by hematoxylin. The remaining cells on upper side were removed of the membrane by scrubbing. Cells in 20 contiguous areas at ×400 magnification for each insert were counted under an inverted microscope (Zeiss). For each experiment, the number of invasive cells per area for each condition was normalized by the mean of non-treated (NT) siControl invasive cells.

Cell proliferation Assays.

Cell proliferation was tested by MTT assay. Cells were seeded in 6-well plates in the same density as migration and invasion assays to prove that the variations observed are not due to a seeding difference. Then, the yellow tetrazolium salts of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) solubilized in culture medium without FCS (0.5 mg / ml) was added to each well and incubated 50 minutes at +37 °C in the dark. In order to dissolve purple formazan crystals, the culture medium was replaced with dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma). Absorbance of each well was quantified at 550 nm using an Infinite F200 Pro reader (TECAN).

Statistical Analysis.

Data are presented as Mean±S.E.M. and the number of experiments or the number of studied cells is represented by n and N refers to the number of cell line passages. Experiments were repeated in three different passages. Statistical analyses were made using Student's t tests or Mann-Whitney rank sumtest depending on sample normality or paired Wilcoxon signed rank test using Sigma-Stat 3.0 (Systat Software, Inc.). When more than two conditions were compared, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used followed by Dunn's method posthoc tests using SigmaStat 3.0 (Systat Software, Inc.). § and * correspond to statistical effect of Cd treatment and siRNA transfection respectively.

RESULTS.

Effect of cadmium exposure on TRPM7 channel functional expression in non-cancer epithelial cells.

Western Blot analysis are performed after Cd exposure to evaluate how TRPM7 expression is altered in MCF10A cells exposed to Cd (Cd) when compared to the non-treated cells (NT). Results are displayed in Figure 1A, B and show that TRPM7 relative expression increases

from 1 in NT cells to 2.0 ± 0.3 in Cd cells ($n=5$; $P < 0.05$). Furthermore, TRPM7 knockdown by siRNA decreases TRPM7 relative expression from 1 to 0.3 ± 0.1 in NT cells ($n=5$ for siControl and $n=4$ for siTRPM7; $P < 0.001$) and from 2.0 ± 0.3 to 0.3 ± 0.2 in Cd cells ($n=5$ for siControl and $n=4$ for siTRPM7; $P < 0.001$). These data show that Cd exposure increases TRPM7 expression in MCF10A cells by 2-fold. We further confirm that Cd exposure increases TRPM7 expression in a similar manner in the non-cancer pancreatic epithelial cell line, hTERT-HPNE (Figure 1C, D).

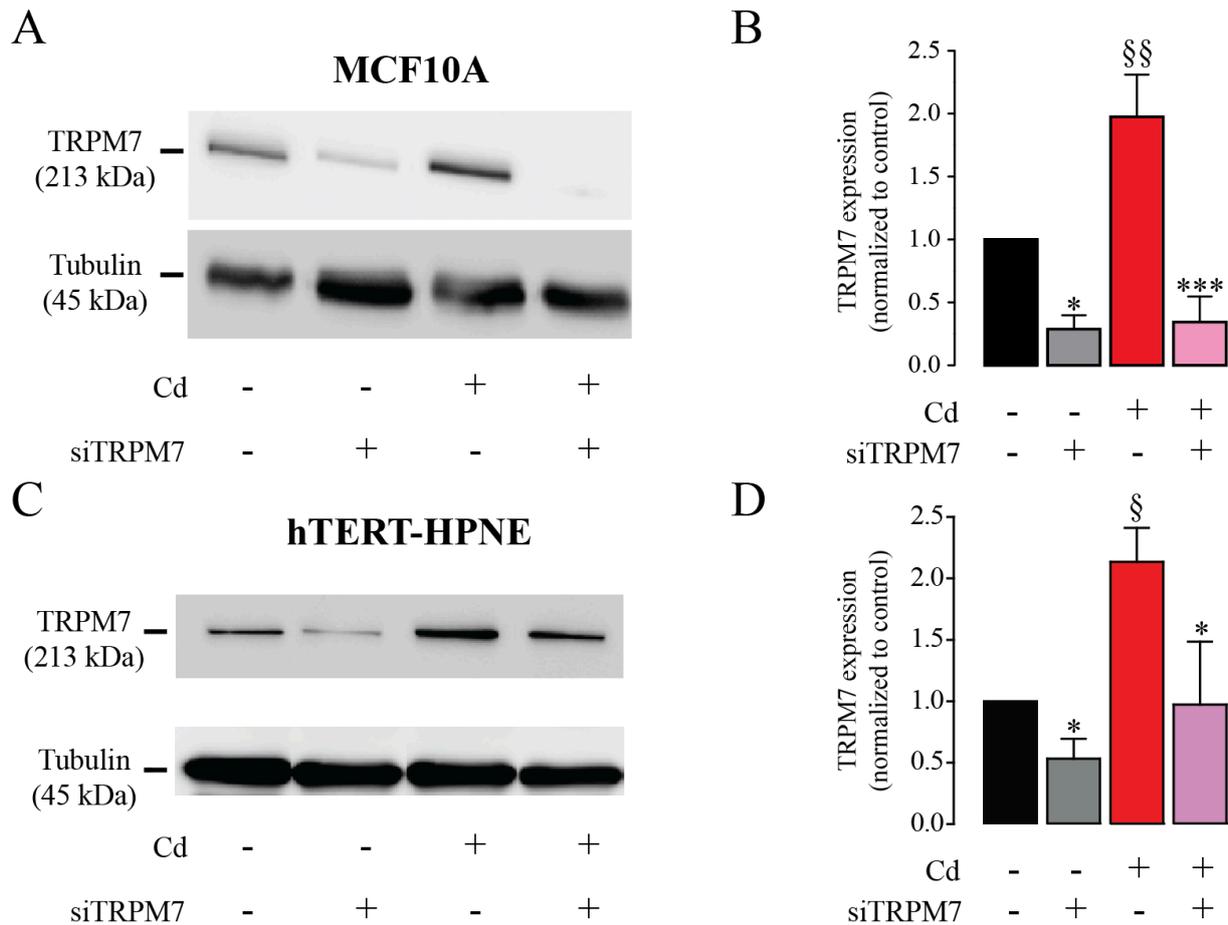


Figure 1: Expression of TRPM7 in non-cancer epithelial cells treated with cadmium.

In order to evaluate TRPM7 activity at the plasma membrane after Cd exposure, Magnesium-Inhibited Cation (MIC) currents (Prakriya and Lewis 2002) are recorded in Cd compared to NT MCF10A cells by using whole-cell patch-clamp. MIC currents were activated by dialyzing the intracellular media by a 0-Mg^{2+} intrapipette solution as previously published (Rybarczyk et al. 2017). An increase of the outward membrane currents (recorded at +100 mV) was observed during the dialysis of the intracellular media by EGTA (figure 2A). the steady state was reached after 16 minutes. Outward currents were larger in Cd cells (55.0 ± 3.8 pA/pF at +100 mV; $n=15$) compared to NT cells (35.8 ± 2.6 pA/pF at +100 mV; $n=14$; $P < 0.001$). MIC current was calculated as the difference between recorded current after intracellular dialysis and the stable current recorded after the patch rupture. The current-

voltage (I-V) relationship of MIC currents were built (figures 2B, C). The I-V relationship has some of the typical features of MIC currents: inward current at negative membrane potentials, reversal potential close to 0-mV and strong outward rectification for positive membrane potentials. MIC currents recorded in Cd cells are larger (44.9 ± 3.9 pA/pF at +100 mV; n=15) than those recorded in NT cells (27.7 ± 2.2 pA/pF at +100 mV; n=15; $P<0.01$; figure 2B).

We use siRNA technique to specifically inhibit TRPM7 expression and we show that the MIC current are largely reduced in Cd cells (8.8 ± 3.1 pA/pF at +100 mV; n=7) when compared to cell transfected with a scrambled siRNA (59.3 ± 7.5 pA/pF at +100 mV; n=8; $P<0.01$; figure 2C). This result shows that the enhanced MIC current recorded in Cd cells is mainly due to TRPM7 membrane channel activity.

Taken together, these data indicate that Cd exposure increases TRPM7 expression and function in MCF10A cells leading to enhanced membrane MIC currents.

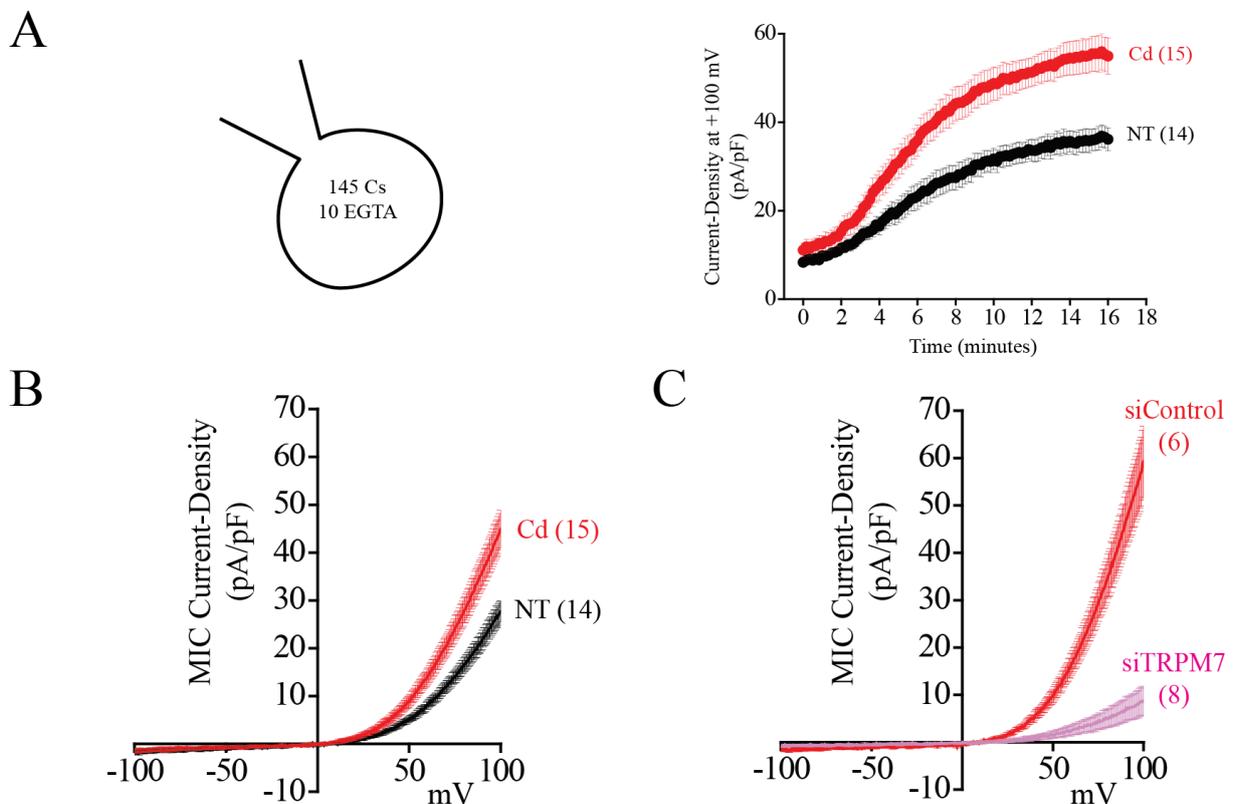


Figure 2: Recording of TRPM7 currents in non-cancer epithelial cells treated with cadmium.

Effect of cadmium exposure on cation influxes, Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis.

TRPM7 is a non-selective cationic channel that mainly conducts Ca^{2+} and Mg^{2+} . Moreover, TRPM7 is permeant to other metals including Mn^{2+} (Monteilh-Zoller et al. 2003). Using Mn^{2+} -quenching technique, we show that Cd exposure increases cation entry in MCF10A (-0.94 ± 0.04 ; n=164) when compared to NT cells (-0.64 ± 0.03 ; n=139; $P<0.001$; figures 3A, B). TRPM7 silencing has no effect on NT cells (-0.70 ± 0.04 ; n=131; $P>0.05$) whereas it strongly

decreases cation entry in Cd cells (-0.38 ± 0.03 ; $n=94$; $P<0.001$; figures 3A, B) indicating that TRPM7 is mainly responsible for enhanced constitutive cation entry in Cd MCF10A.

Next, we aim to study how Cd exposure alters Ca^{2+} - and Mg^{2+} intracellular homeostasis. As shown in the figure 3C, the cytosolic basal fluorescence of the Ca^{2+} -sensitive Fura-2 AM probe is larger in Cd MCF10A (1.29 ± 0.01 ; $n=73$) when compared to the NT ones (1.20 ± 0.01 ; $n=119$; $P<0.05$). TRPM7 silencing increases Fura-2 fluorescence in NT cells (1.24 ± 0.01 ; $n=85$; $P<0.05$) whereas it is decreased in Cd ones (1.20 ± 0.01 ; $n=71$; $P<0.001$).

The homeostasis of Mg^{2+} was also studied using the Mg^{2+} -sensitive MagFura-2 AM fluorescent probe (Figure 3D). Cd exposure increases cytosolic fluorescence in MCF10A (1.26 ± 0.02 ; $n=72$) when compared to the NT cells (1.12 ± 0.02 ; $n=101$; $P<0.001$). TRPM7 silencing has no effect on NT cells (1.07 ± 0.02 ; $n=77$; $P>0.05$) whereas it strongly decreases Mg^{2+} homeostasis in Cd cells (0.94 ± 0.03 ; $n=55$; $P<0.001$).

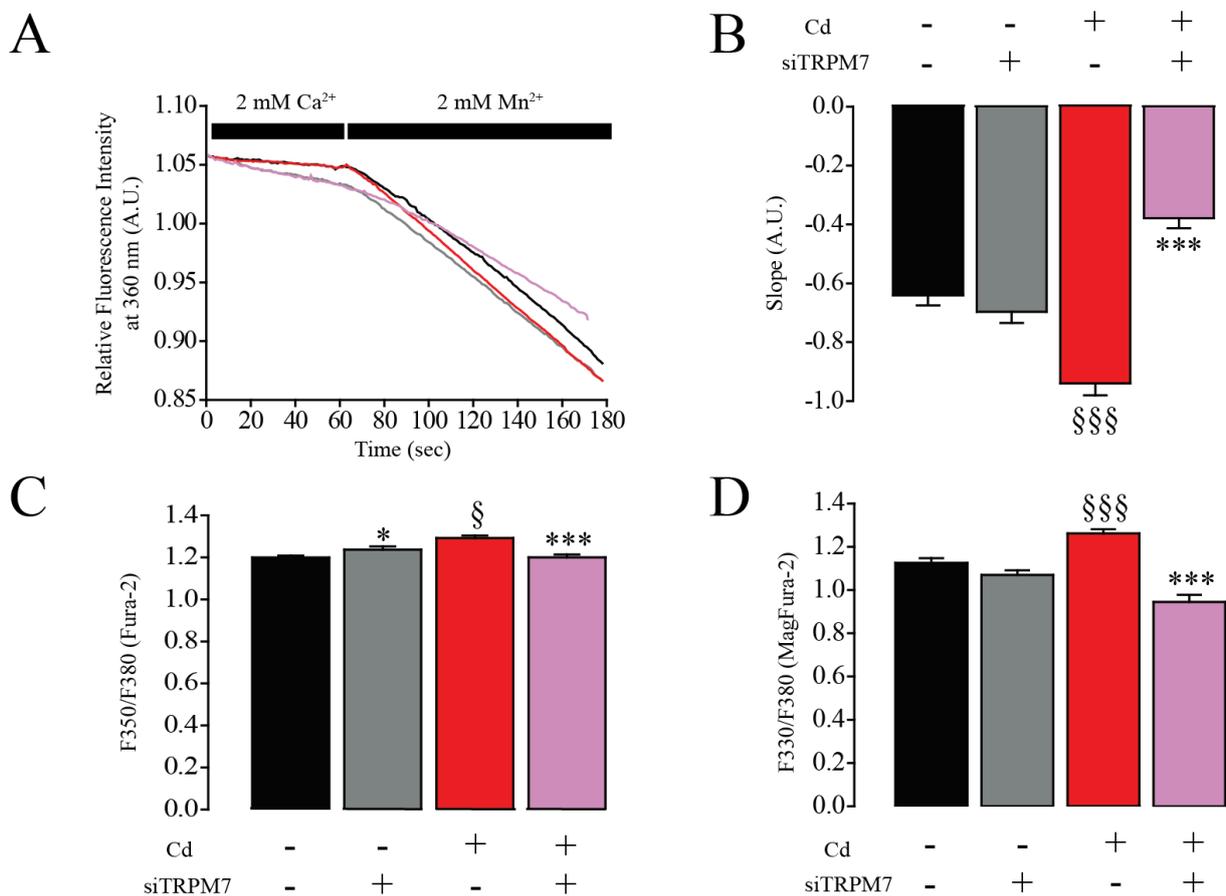


Figure 3: Effects of Cd exposure on TRPM7-mediated cation entries, Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis (MCF10A).

The effect of Cd exposure in cation influxes was also studied in hTERT-HPNE cells (Figure 4). Contrarily to MCF10A cells (-0.64 ± 0.03 ; $n=139$), the basal Mn^{2+} -quenching slope is weak

(-0.15 ± 0.04 ; $n=70$) suggesting that there is hardly any constitutive cation entry in non-cancer pancreatic epithelial cells. As for MCF10A cells, Cd exposure increases cation entry (-0.44 ± 0.04 ; $n=111$; $P < 0.05$; Figure 4A, B). TRPM7 silencing has no effect on NT cells (-0.14 ± 0.03 ; $n=79$; $P > 0.05$) whereas it almost abolishes cation entry in Cd cells (-0.06 ± 0.03 ; $n=67$; $P < 0.05$; Figures 4A, B).

Cd exposure increases Ca^{2+} homeostasis in hTERT-HPNE cells (1.42 ± 0.01 ; $n=87$) compared to the NT ones (1.34 ± 0.01 ; $n=79$; $P < 0.05$; Figure 4C). TRPM7 silencing has no effect on NT cells (1.33 ± 0.01 ; $n=57$; $P > 0.05$) whereas it decreases Ca^{2+} homeostasis in Cd cells (1.36 ± 0.02 ; $n=47$; $P < 0.05$).

Mg^{2+} cytosolic concentration is larger in hTERT-HPNE exposed to Cd (1.78 ± 0.03 ; $n=103$) than in NT cells (1.44 ± 0.03 ; $n=93$; $P < 0.05$). In NT cells, TRPM7 silencing induces an increase of cytosolic Mg^{2+} (1.55 ± 0.05 ; $n=54$; $P < 0.05$) whereas it induces a decrease of cytosolic Mg^{2+} in Cd cells (1.31 ± 0.03 ; $n=63$; $P < 0.05$; Figure 4D).

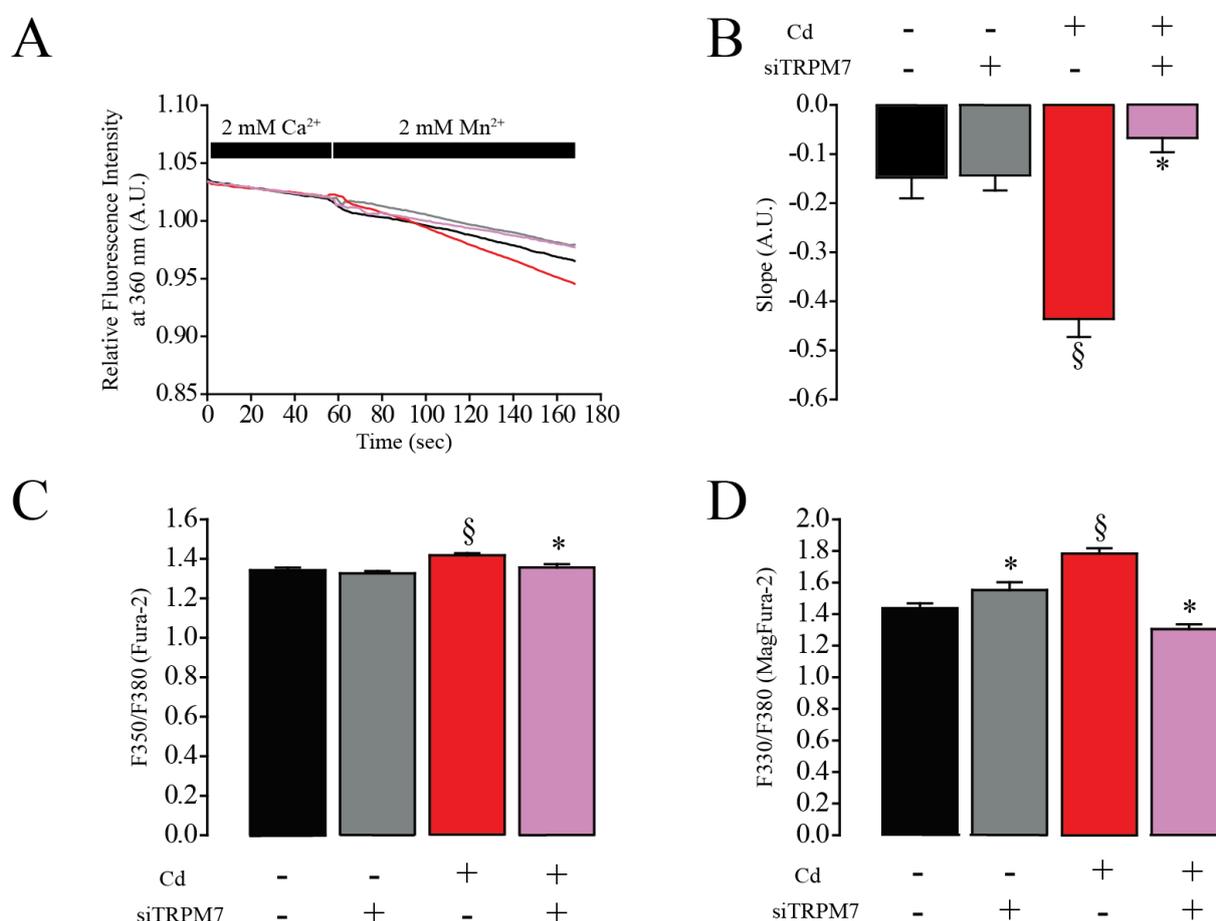


Figure 4: Effects of Cd exposure on TRPM7-mediated cation entries, Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis (hTERT-HPNE).

To summarize, Cd exposure induces an increase of cation constitutive entry in both MCF10A and hTERT-HPNE cells as well as higher Ca^{2+} and Mg^{2+} cytosolic concentrations. These effects of Cd exposure are abolished by TRPM7 silencing.

Effect of cadmium exposure on non-cancer epithelial cell shape and organization.

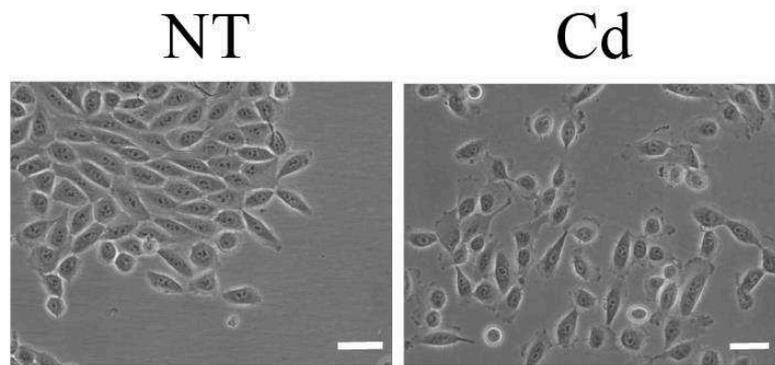
The membrane capacitance recorded by using whole-cell patch clamp can be used to estimate membrane surface. We do not observe any difference between Cd-treated (19.9 ± 1.1 pF; $n=36$) and non-treated cells (19.5 ± 1.0 pF; $n=90$; $P > 0.05$) indicating that Cd exposure do not change the lipid bilayer surface.

On the other hand, a modification of the cell organization was observed in MCF10A cells following Cd exposure (Figure 5). Indeed, NT cells are organized as clusters whereas Cd cells are more individualized (Figure 5A). TRPM7 silencing restores cell clustering in Cd MCF10A (Figure B). However, Cd exposure has no effect on hTERT-HPNE cells (supplementary data).

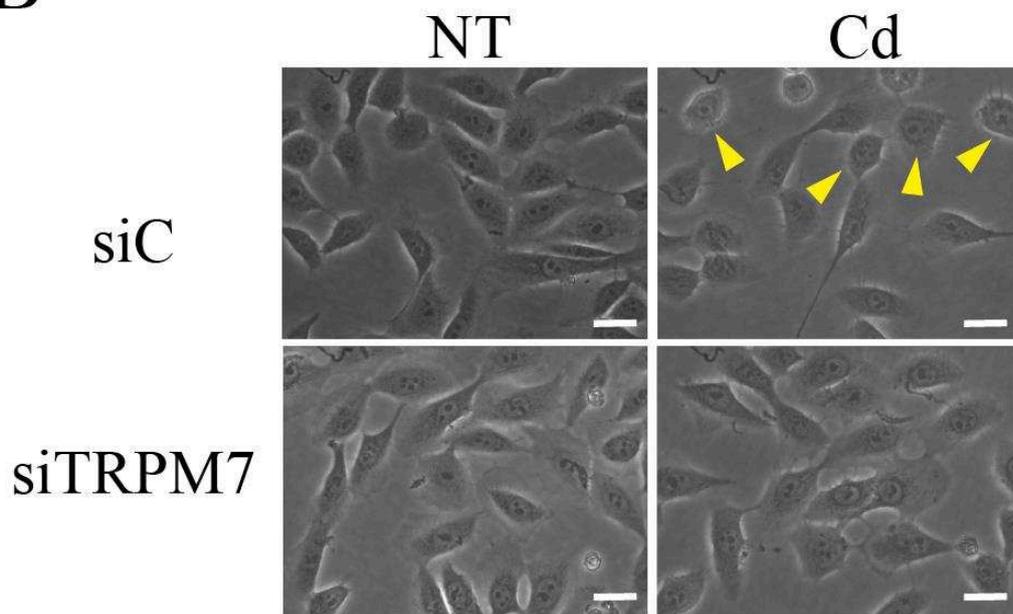
Moreover, many MCF10A cells exposed to Cd present a rounded morphology with short prolongments of the plasma membrane (figure 5B, yellow arrows). Indeed, Cd cells have a higher circularity index (0.82 ± 0.01 ; $n=192$) than NT cells (0.71 ± 0.01 ; $n=197$; $P < 0.05$; Figure 5C). TRPM7 silencing has no effect on NT cells (0.73 ± 0.01 ; $n=193$) but it reverses the effects of Cd exposure (0.72 ± 0.01 ; $n=186$; $P < 0.05$; Figure 5C).

Taken together our data show that Cd exposure induces a change in MCF10A cell phenotype which is mediated by TRPM7 channel.

A



B



C

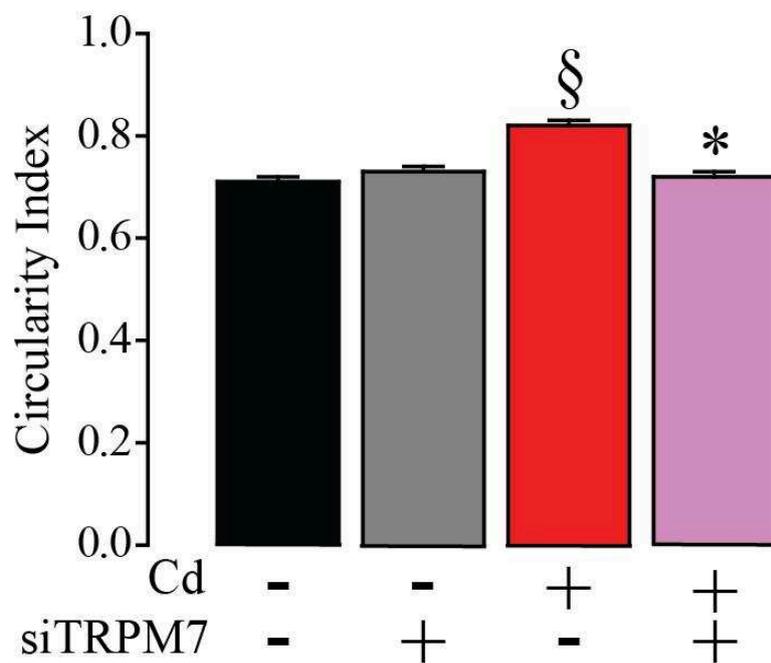


Figure 5: Effect of Cd exposure on MCF10A cell organization and morphology.

Expression of EMT markers in Cd treated MCF10A cells.

The first step of metastasis cascade is the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Here, we assessed the expression of some EMT markers in MCF10A cells following Cd exposure (Figure 6). E-Cadherin expression is decreased from 1 to 0.56 ± 0.08 in Cd MCF10A when compared to the NT ones ($n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, B). TRPM7 silencing partially restores E-Cadherin expression in Cd MCF10A cells (0.76 ± 0.08 ; $n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, B) when compared to the Cd MCF10A cells transfected with a control siRNA. On the other hand, N-Cadherin expression is increased from 1 to 3.35 ± 0.70 in Cd MCF10A when compared to the NT ones ($n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, C). TRPM7 silencing restores N-Cadherin expression in Cd MCF10A cells (1.66 ± 0.48 ; $n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, C). Vimentin expression is much more increased in Cd MCF10A cells (6.55 ± 1.34 ; $n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, D) than in NT ones. Again, TRPM7 silencing partially prevents vimentin overexpression in Cd MCF10A (3.71 ± 0.67 ; $n=8$; $P<0.05$; Figure 6A, D) when compared to the Cd MCF10A transfected with a control siRNA.

Our results show that Cd exposure induces EMT in MCF10A and that TRPM7 channel participates to this mechanism.

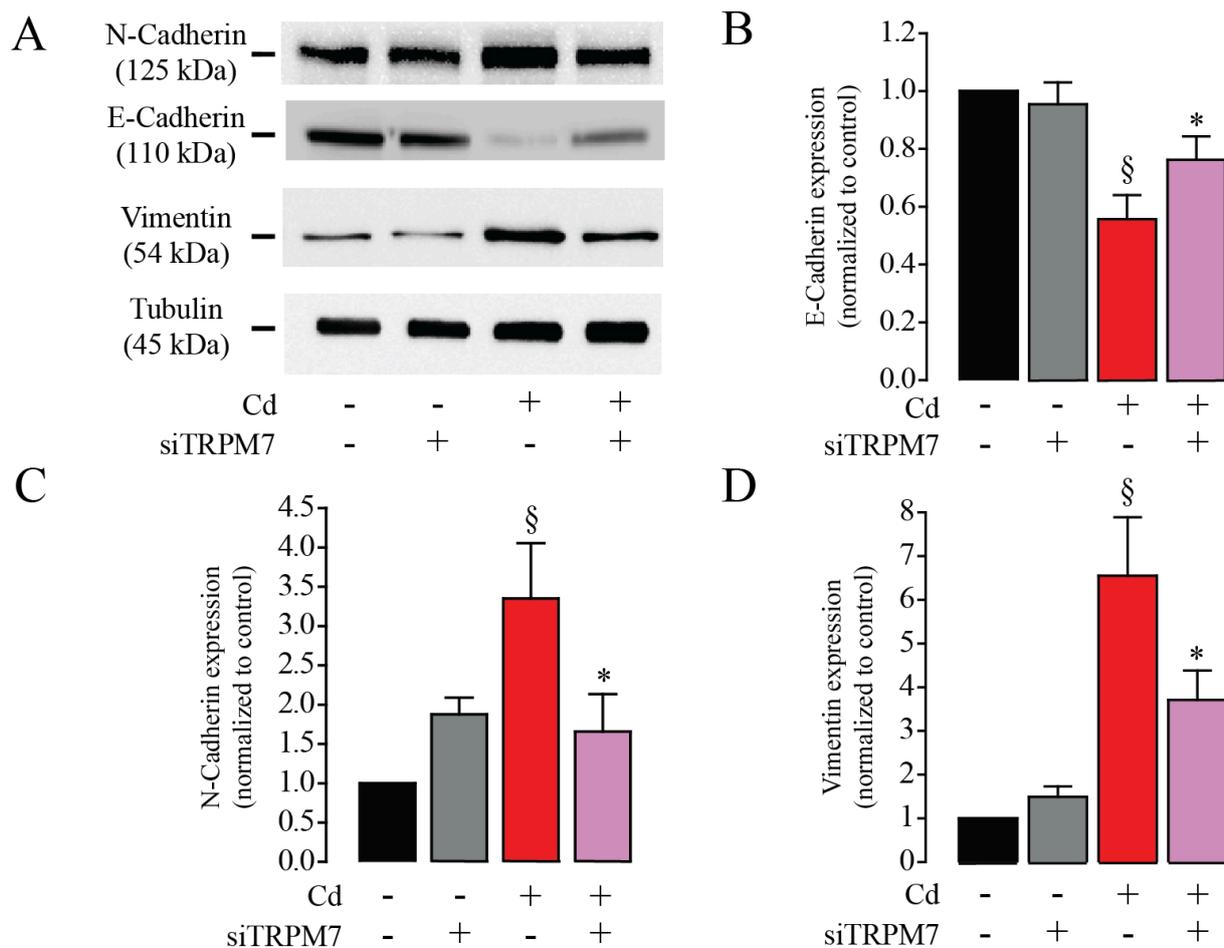


Figure 6: Effect of Cd exposure on EMT markers in MCF10A cells.

Role of TRPM7 in cell migration and invasion induced by cadmium exposure.

Cd exposure enhances the properties of MCF10A to fill the empty space induced by a scratch test (Figure 7A). The scratch is fully covered by Cd MCF10A cells after 24h when compared to the NT cells (0.12 ± 0.01 ; $n=9$; $P < 0.05$). TRPM7 silencing reduces the cell motility in Cd MCF10A (0.17 ± 0.02 ; $n=9$; $P < 0.05$). To confirm these results, we tested the properties of cells to migrate by using Boyden chamber assays. Cd exposure stimulates MCF10A cell migration from 1.00 ± 0.03 to 1.30 ± 0.03 when compared to the NT cells ($n=164$; $P < 0.05$; Figure 7B). TRPM7 silencing inhibits cell migration in NT cells (0.48 ± 0.02 ; $n=164$; $P < 0.05$) and much more in Cd cells (0.35 ± 0.02 ; $n=164$; $P < 0.05$; Figure 7B).

It has been shown that cell invasion is enhanced by Cd exposure in transformed MCF10A cells (Benbrahim-Tallaa et al. 2009) and in human pancreatic ductal epithelial cells (Qu et al. 2012). Here, we confirm that Cd exposure enhances MCF10A cell invasion (Figure 7C). Cell invasion was increased from 1.00 ± 0.06 to 1.51 ± 0.06 in Cd MCF10A when compared to the NT ones ($n=120$; $P < 0.05$). As for cell migration, TRPM7 silencing inhibits cell invasion in NT cells (0.45 ± 0.03 ; $n=120$; $P < 0.05$) and much more in Cd cells (0.25 ± 0.01 ; $n=120$; $P < 0.05$).

Cd exposure also enhances cell invasion in hTERT-HPNE as shown in the figure 7D. Indeed, the cell invasion is increased from 1.00 ± 0.04 to 1.45 ± 0.04 in Cd cells compared to the NT ones ($n=60$; $P<0.05$). TRPM7 silencing has no effect in NT cells (0.99 ± 0.03 ; $n=60$; $P>0.05$) whereas it inhibits the cell invasion in Cd cells (0.66 ± 0.03 ; $n=60$; $P<0.05$, Figure 7D).

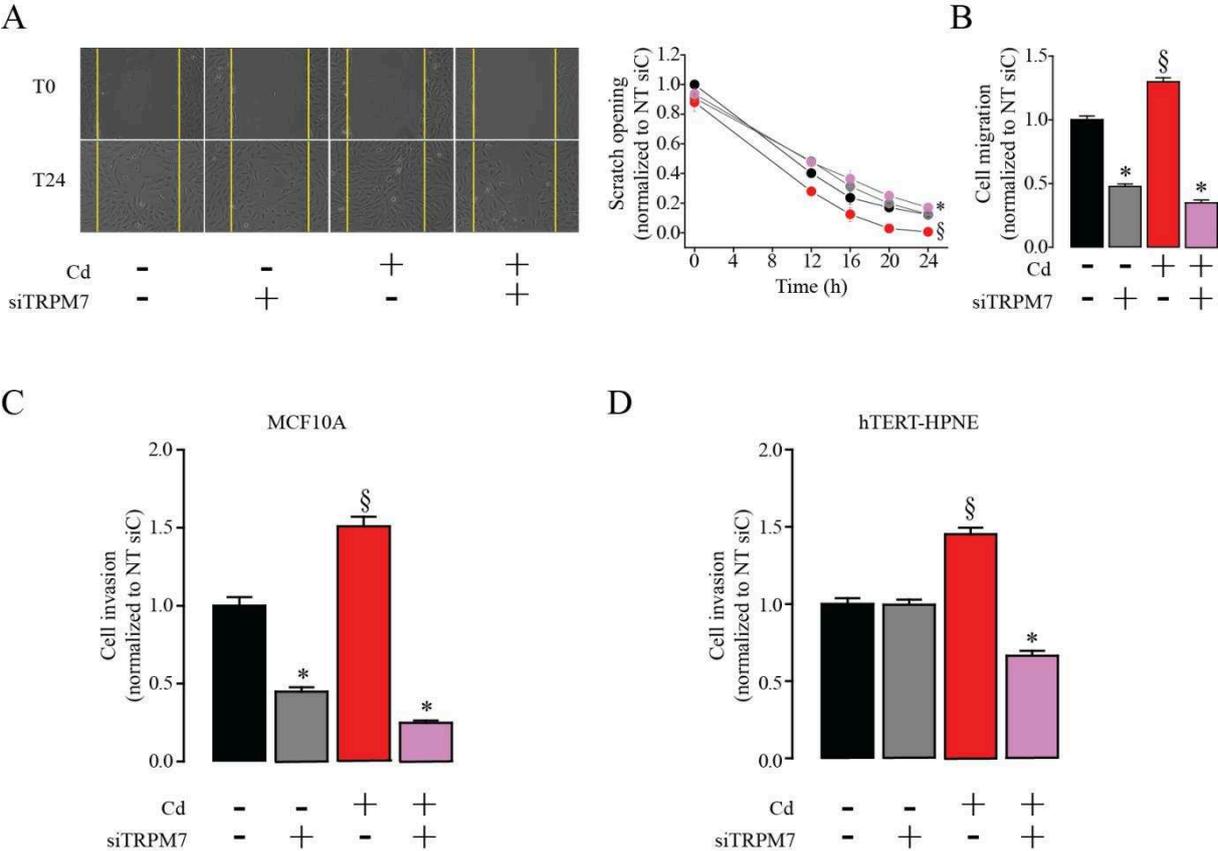


Figure 7: Effect of Cd exposure on non-cancer epithelial cell migration and invasion.

DISCUSSION.

Previous studies have already shown that Cd exposure leads to non-cancer epithelial cell transformation into an invasive phenotype (Qu et al. 2012; Benbrahim-Tallaa et al. 2009). However, we show for the first time that TRPM7 channels participate to this neoplastic transformation. TRPM7 is an ubiquitously channel which is overexpressed in numerous cancer and which is involved in cancer cell proliferation, migration and invasion (Gautier et al. 2016).

Cd exposure induces TRPM7 overexpression in both human mammary and pancreatic non-cancer epithelial cells confirming that TRPM7 could be used as a biomarker for neoplastic cell transformation. To our knowledge, our study provided a unique cellular model of TRPM7 overexpression induced by pollutant exposure.

TRPM7 overexpression induces an increase of both TRPM7 membrane currents and cation constitutive entry. In consequence, both cytosolic Ca^{2+} and Mg^{2+} are increased in Cd exposed cells. These results are surprising for mammary cells because we previously showed that TRPM7 regulates Ca^{2+} homeostasis in non-invasive MCF-7 breast cancer cells (Guilbert et al. 2009) whereas the channel silencing had no effect on Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis in both invasive MDA-MB-231 and MDA-MB-435S cancer cells (Guilbert et al. 2013). Moreover, TRPM7 regulates metastasis formation and dissemination in a model of mouse xenograft using MDA-MB-231 by regulating myosin II-based cellular tension (Middelbeek et al. 2012). While TRPM7 promotes the formation of Ca^{2+} sparks and invadosome in neuroblastoma cells, the role of TRPM7 on invadosome formation is independent of Ca^{2+} influx (Visser et al. 2013). However, the role of Mg^{2+} has not been assessed in these studies.

Regarding the pancreatic cells, we and others previously showed that TRPM7 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma in relation with metastasis and survival (Rybarczyk et al. 2012; Rybarczyk et al. 2017; Yee et al. 2015). TRPM7 regulates both pancreatic cancer cell migration and invasion through Mg^{2+} entry (Rybarczyk et al. 2012; Rybarczyk et al. 2017). It has been recently shown that TRPM7 also participates to Mg^{2+} uptake and cell proliferation in cancer colon cells (Luongo et al. 2018). Here, Cd exposure promotes cytosolic Mg^{2+} increase in a stronger manner than for Ca^{2+} . Taken together with the recent literature, our data strongly suggest that TRPM7 overexpression leads to enhanced cytosolic Mg^{2+} in epithelial cells exposed to Cd.

Interestingly, MCF10A exposed to Cd are not organized in clusters and have a rounded-shaped morphology. These effects can be reverted by silencing TRPM7. TRPM7 knockdown can disorganize cytoskeleton in mesenchymal MDA-MB-231 which lose their spindle-shaped morphology (Middelbeek et al. 2012). TRPM7 is also known to participate to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer (Davis et al. 2014; Kuipers et al. 2018; Sun et al. 2018). In the present study, we also demonstrate that Cd exposure increases EMT markers, N-Cadherin and Vimentin while E-Cadherin is decreased in mammary epithelial cells (Figure 6). Importantly, TRPM7 silencing dramatically reduces EMT marker expression and increases E-Cadherin expression in mammary epithelial cells exposed to Cd. EMT marker expression and the acquisition of a rounded-shaped morphology strongly suggest that Cd exposure induces collective-to-amoeboid transition in MCF10A. Interestingly, it has been shown that hypoxia promotes EMT in epithelial cancer cells leading to collective-to-amoeboid migration (Lehmann et al. 2017). Surprisingly, Cd exposure had no effect on pancreatic cell morphology nor on EMT marker expression (data not shown).

Cd exposure enhances cell invasion in both mammary and pancreatic epithelial cells as already published (Qu et al. 2012; Benbrahim-Tallaa et al. 2009). Here we show that TRPM7 regulates invasiveness in mammary non-cancer epithelial cells. Moreover, TRPM7 silencing almost fully abolishes invasiveness in Cd exposed cells suggesting that Cd-induced cell invasion is mainly regulated by TRPM7 in mammary epithelial cells.

On the other hand, TRPM7 does not regulate cell invasion in non-cancer pancreatic epithelial cells but TRPM7 silencing strongly reduces Cd-induced cell invasion as for pancreatic cancer

cells (Rybarczyk et al. 2017). Taken together these results confirm that TRPM7 is a key player of invasiveness in both cancer and transformed cells.

In conclusion, we show that TRPM7 is overexpressed in Cd-exposed epithelial cells leading to enhanced cell invasiveness through Mg²⁺ homeostasis unbalance.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements:

AV is a recipient from the Region Hauts-de-France. This work has been supported by FEDER, La Ligue Contre le Cancer comité de l'Oise, le Cancéropôle Nord-Ouest.

REFERENCES

- Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. 2014. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res* 24(4): 378-399.
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A. 2015. Urinary cadmium concentration and risk of breast cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Am J Epidemiol* 182(5): 375-380.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, et al. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature medicine* 9(8): 1081-1084.
- Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C, Mediavilla MD, Cos S, Gonzalez A, Ramos S, et al. 2006. Melatonin inhibits both ER alpha activation and breast cancer cell proliferation induced by a metalloestrogen, cadmium. *J Pineal Res* 40(4): 291-296.
- Qu W, Tokar EJ, Kim AJ, Bell MW, Waalkes MP. 2012. Chronic cadmium exposure in vitro causes acquisition of multiple tumor cell characteristics in human pancreatic epithelial cells. *Environ Health Perspect* 120(9): 1265-1271.
- Benbrahim-Tallaa L, Tokar EJ, Diwan BA, Dill AL, Coppin JF, Waalkes MP. 2009. Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype. *Environ Health Perspect* 117(12): 1847-1852.
- Thevenod F. 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals* 23(5): 857-875.
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. 2003. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121(1): 49-60.
- Martineau C, Abed E, Medina G, Jomphe LA, Mantha M, Jumarie C, et al. 2010. Involvement of transient receptor potential melastatin-related 7 (TRPM7) channels in cadmium uptake and cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Toxicology letters* 199(3): 357-363.
- Gautier M, Perriere M, Monet M, Vanlaeys A, Korichneva I, Dhennin-Duthille I, et al. 2016. Recent Advances in Oncogenic Roles of the TRPM7 Chanzyme. *Curr Med Chem* 23(36): 4092-4107.
- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Haren N, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. 2009. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297(3): C493-502.
- Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H, et al. 2013. Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur J Cancer* 49(17): 3694-3707.
- Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horsen R, et al. 2012. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res* 72(16): 4250-4261.
- Rybarczyk P, Gautier M, Hague F, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Kerr-Conte J, et al. 2012. Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer* 131(6): E851-861.
- Rybarczyk P, Vanlaeys A, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Sevestre H, et al. 2017. The Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion through the Hsp90alpha/uPA/MMP2 pathway. *Neoplasia* 19(4): 288-300.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391(2): 85-100.
- Fasolato C, Hoth M, Penner R. 1993. Multiple mechanisms of manganese-induced quenching of fura-2 fluorescence in rat mast cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 423(3-4): 225-231.
- Prakriya M, Lewis RS. 2002. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol* 119(5): 487-507.
- Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, et al. 2013. TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium* 54(6): 404-415.

Yee NS, Kazi AA, Li Q, Yang Z, Berg A, Yee RK. 2015. Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis. *Biology open* 4(4): 507-514.

Luongo F, Pietropaolo G, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Ouadid-Ahidouch H, Wolf FI, et al. 2018. TRPM6 is Essential for Magnesium Uptake and Epithelial Cell Function in the Colon. *Nutrients* 10(6).

Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW, Jr., et al. 2014. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33(18): 2307-2316.

Kuipers AJ, Middelbeek J, Vrenken K, Perez-Gonzalez C, Poelmans G, Klarenbeek J, et al. 2018. TRPM7 controls mesenchymal features of breast cancer cells by tensional regulation of SOX4. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(7): 2409-2419.

Sun Y, Schaar A, Sukumaran P, Dhasarathy A, Singh BB. 2018. TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells is mediated via TRPM7 expression. *Molecular carcinogenesis* 57(6): 752-761.

Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, et al. 2017. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Current biology : CB* 27(3): 392-400.

4. DECOUVERTES RECENTES SUR LES ROLES ONCOGENIQUES DU CANAL

TRPM7

4.1. Résumé

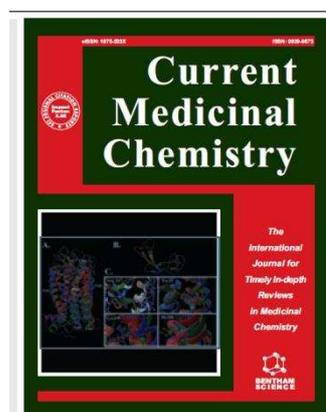
Depuis la découverte de TRPM7 en 2001, un nombre croissant de publications se sont concentrées sur les implications du chanzyme dans les mécanismes physiologiques et pathologiques. TRPM7 joue un rôle dans les anomalies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives mais également dans le cancer (Visser et al., 2014). La surexpression aberrante de TRPPM7 en corrélation avec les paramètres cliniques est décrite pour certains cancers. TRPM7 joue un rôle dans les mécanismes oncogéniques par ces deux fonctions canal et kinase. Cette revue fait une synthèse des connaissances sur le rôle oncogénique de TRPM7.

4.2. Revue 1

Recent Advances in oncogenic roles of the TRPM7 Chanzyme

Mathieu Gautier, Marianne Perrière, Michael Monet, Alison Vanlaeys,
Irina Korichneva, Isabelle Dhennin-Duthille and Halima Ouadid-Ahidouch

Received : March 11,2016 Accepted : July 01,2016 Published : August 05, 2016



Current Medicinal Chemistry

REVIEW ARTICLE

Recent Advances in Oncogenic Roles of the TRPM7 Chanzyme

Mathieu Gautier^{*}, Marianne Perrière, Michael Monet, Alison Vanlaeys, Irina Korichneva, Isabelle Dhennin-Duthille and Halima Ouadid-Ahidouch

Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, LPCM - EA4667, University of Picardie Jules Verne, UFR Sciences, SFR CAP-Santé (FED 4231), 33, St-Leu street, F-80039 Amiens, France

Abstract: Transient Receptor Potential Melastatin-related 7 (TRPM7) is a non-selective cation channel fused with a functional kinase domain. Physiologically, TRPM7 channel is involved in magnesium homeostasis, cell survival and gastrulation. The channel part is responsible for calcium, magnesium, and metal trace entries. Cation current through TRPM7 channel is inhibited by both intracellular magnesium and magnesium complexed with nucleotides. In parallel, the kinase is able to phosphorylate cytoskeleton proteins like myosin chain regulating cell tension and motility. Moreover, TRPM7 kinase domain can be cleaved by caspase and participates to apoptosis signaling. Importantly, TRPM7 channel expression is aberrant in numerous cancers including breast, glioblastoma, nasopharynx, ovarian, and pancreatic. Moreover, TRPM7 high expression is an independent biomarker of poor outcome in breast cancer. Pharmacological modulation or silencing of TRPM7 strongly affects proliferation, adhesion, migration or invasion in cancer cell lines. Nevertheless, it is still not clear by which mechanism TRPM7 channels may disturb cancer cell hallmarks. In the present review, we will discuss the role of TRPM7 channels in malignancies. In particular, we will distinguish the role of cation signaling from kinase function in order to better understand how TRPM7 channels may play a central role in cancer progression. We will also discuss the recent advances in pharmacological blockers of TRPM7 and their potential use for cancer therapy.

ARTICLE HISTORY

Received: March 11, 2016
Revised: July 01, 2016
Accepted: August 05, 2016

DOI: 10.2174/0929867323666160907162002

Keywords: TRPM7, epithelial cancer, calcium, magnesium, kinase, pharmacological blockers.

1. TRPM7 STRUCTURE TO FUNCTION RELATIONSHIP

TRPM7 channel is a member of the superfamily of TRP cation channels [1]. This atypical channel is fused with a serine/threonine kinase leading to an emerging new class of channels called “chanzyme” [2]. The kinase domain was partially cloned and described for the first time in Alexey Ryazanov’s laboratory [3], and the cloning and electrophysiological characterization of the full channel were made by Andrea Fleig and David Clapham’s laboratories [4, 5]. This cation channel is involved in voltage-independent Ca^{2+} and Mg^{2+} influxes.

1.1. TRPM7 Gene and Protein

The *TRPM7* encoding gene official full name is transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7. In Homo sapiens, the *TRPM7* gene is located on chromosome 15q21 and contains 40 exons (NCBI gene ID: 54822). The gene encodes for a 1,865 amino acids cation channel containing a serine/threonine kinase at its C-terminus [6]. At the plasma membrane, the channel assembles as a homo- or heterotetrameric protein if associated with its close homolog TRPM6 [7]. The TRPM7 subunit structure is close to voltage-gated K channel α -subunit structure. It contains six transmembrane spanning segments (S1 – S6) and both intracellular N- and C-terminal extremities (Fig. 1). The N-terminus of TRPM7 contains four Melastatin Homology Domains (MHD) conserved along the TRPM subfamily, and a hydrophobic region

^{*}Address correspondence to this author at the University of Picardie Jules Verne, F-80039, France; Tel: +33 322827647; Fax: +33 322827550; E-mail: mathieu.gautier@u-picardie.fr

Human TRPM7 subunit (1,865 amino acids)

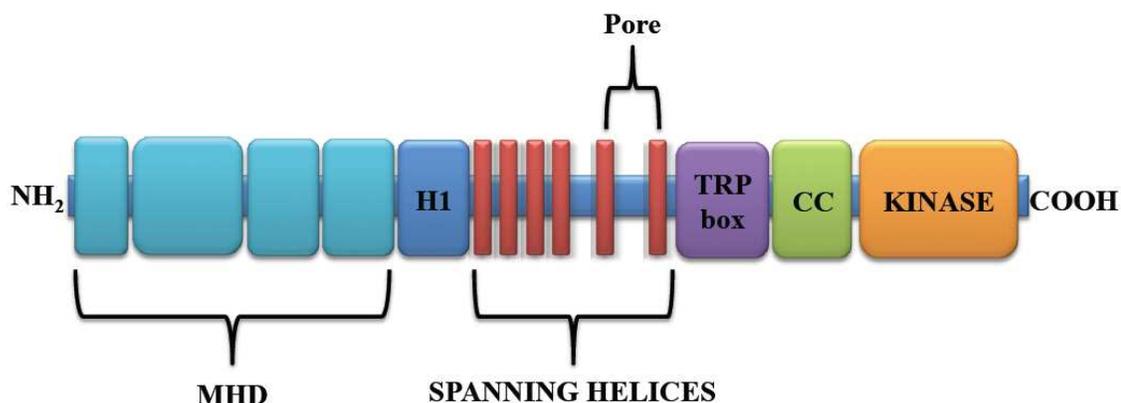


Fig. (1). Structure of human TRPM7 subunit.

called H1. Contrarily to the other TRP subfamilies, TRPM channels do not contain amino-terminal ankyrin repeats. The C-terminus of TRPM7 contains the “TRP” box conserved in all TRP ion channels [8], followed by a coiled-coil (CC) domain that underlies channel assembly and trafficking [9]. There is good structural compatibility between TRPM7 and TRPM6 CC domains indicating that these proteins can form heterotetramers in biological membranes [9]. The crystal structure of TRPM7 CC domain reveals a four stranded antiparallel CC structure that constitutes a linker between the tetrameric transmembrane region and dimeric cytoplasmic kinase domain [9]. This latter region is one of the unique features of TRPM7 and TRPM6 channels.

1.2. TRPM7 Kinase Function

TRPM7 kinase domain belongs to the α -kinases, a unique protein kinase family that displays no amino-acid sequence homology with conventional protein kinases, including eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase (eEF2K) and *Dictyostelium* myosin heavy chain kinases A, B and C (MHCK A-C) [3, 10, 11]. TRPM7 kinase domain is a 95 kDa intracellularly region located at the C-terminus. In solution, TRPM7 kinase domain exits as a dimer. TRPM7 channels are functional as tetramers, thus it is suggested that TRPM7 kinase domains are structurally organized as “dimer of dimers” *in vivo* [12, 13]. Moreover, the C-terminal lobe of the TRPM7 kinase domain contains a zinc finger homology domain [13]. TRPM7 kinase domain is resistant to staurosporine, a conventional protein kinase inhibitor, whereas it is inhibited by rottlerin with an IC_{50} of $\sim 35 \mu\text{M}$ [12]. TRPM7 is able to autophosphorylate predominantly on serine and to phosphorylate sub-

strates in the vicinity of the kinase domain on serine and threonine residues. On the other hand, TRPM7 autophosphorylation on a Ser/Thr rich region immediately N-terminal of the catalytic domain is important for substrate recognition leading to a better access of the kinase domain to the substrate and an optimum phosphorylation [14]. Interestingly, it has been shown that substrate phosphorylation by TRPM7 kinase domain can be regulated by ions. Indeed, Mg^{2+} and Mn^{2+} stimulate TRPM7 kinase domain activity while Ca^{2+} has no effect, and Zn^{2+} or Co^{2+} inhibits kinase activity [12, 15]. Despite divalent cations modulate TRPM7 kinase domain activity, this latter is not necessary for TRPM7 channel activity [15-17]. However, TRPM7 kinase domain may regulate channel activity in some cases [17-19].

TRPM7 channel can interact with intracellular proteins through its kinase domain. TRPM7 kinase domain directly phosphorylates Phospholipase C (PLC) and particularly PLC γ 2 at position Ser1164 in the C2 domain and at position Thr1045 in the linker between the catalytic region and the C2 domain in B cells [20]. Interestingly, B cells transfected with the PLC γ 2-S1164A mutant have a normal calcium response following B-Cell Receptor (BCR) activation under physiological Mg^{2+} conditions, but exhibit a lower response under hypomagnesian conditions [20], suggesting that TRPM7 kinase domain acts as a sensor of cellular Mg^{2+} . It has been shown recently that divalent cation and particularly Mg^{2+} influx through TRPM7 accumulates Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) and reduces its availability to PLC [26]. TRPM7 stimulation by bradykinin induces Ca^{2+} - and kinase-dependent interactions with the actomyosin protein complex. In particular, TRPM7 kinase domain directly phosphorylates

myosin IIA heavy chain leading to a loss of cortical tension and podosome formation [21]. TRPM7 kinase domain phosphorylates myosin IIA heavy chain at residues Thr1800, Ser1803 and Ser1808 in the CC domain [22]. Annexin1 was also identified as a substrate for TRPM7 kinase domain as TRPM7 phosphorylates annexin1 at Ser5 in the N-terminal α -helix [23]. TRPM7-dependent phosphorylation of annexin 1 prevents α -helical conformation and subsequent binding of the peptide to substrate [24]. While eukaryotic elongation Factor 2 (eEF2) is not a direct substrate of TRPM7 kinase domain, TRPM7 regulates the activity of eEF2K. Indeed, TRPM7 kinase domain phosphorylates eEF2K on Ser77 under hypomagnesian conditions leading to increased protein stability and enhanced eEF2 phosphorylation [25]. These data support the idea that TRPM7 kinase domain acts as a cellular sensor adjusting the level of physiological processes to ion availability. Recently, it has been shown that TRPM7 kinase domain could be cleaved under pro-apoptotic conditions [19]. The TRPM7 kinase cleaved fragments translocate to the nucleus and bind multiple components of chromatin-remodeling complexes in a Zn^{2+} -dependent manner [26]. This novel TRPM7 kinase function is important for cellular processes such as cell differentiation.

1.3. Electrophysiological Characteristics of TRPM7 Channel

The TRPM7 current is described as Magnesium-Inhibited Cation (MIC) and Magnesium Nucleotide-regulated Metal ion (MagNuM) currents [4, 27]. Membrane currents were induced by a depletion of internal Mg^{2+} and recorded by depolarizing ramps or steps. Typical TRPM7 current/voltage relationships show an inward component at negative potentials due to Ca^{2+}/Mg^{2+} influxes and a strong outward rectification at positive potentials due to K^+ or Cs^+ outflow depending of experimental conditions [4]. One of the TRPM7 current important features is its sensitivity to internal Mg^{2+} and Mg^{2+} complexed with nucleotides [4, 5]. Thus, TRPM7 currents can be recorded in whole-cell patch-clamp configuration by dialysis of intracellular media with intrapipette solution containing Mg^{2+} chelators like EGTA or EDTA. Internal TRPM7 sensitivities to Mg^{2+} and Mg-nucleotides are due to specific cation binding to intracellular parts of the channel. Thus, the Mg^{2+} dose-response curves built in single channel recording experiments reveal biphasic profile with two IC_{50} of 25 μM and 91 μM [28]. These data suggest that TRPM7 channels are blocked by intracellular free- Mg^{2+} at two separate binding sites with different affini-

ties for Mg^{2+} . These two binding sites are localized within the kinase domain and on intracellular face of the channel pore [17, 18]. Indeed, while TRPM7 kinase domain is not required for channel activity, abolition of phosphotransferase activity by single-point mutations or kinase domain deletion dramatically reduces Mg^{2+} sensitivity to TRPM7 channels [17]. TRPM7 inhibition by Mg^{2+} -nucleotides is due to a binding site localized within the kinase domain [17, 18]. The Mg-nucleotides binding site can discriminate nucleotides with the following efficiency to inhibit TRPM7 currents: $MgATP > MgTTP > MgCTP \geq MgGTP \geq MgUTP > MgITP \sim$ free-Mg [18]. Moreover, TRPM7 inhibition by Mg-nucleotides is synergistically enhanced by intracellular free- Mg^{2+} [18]. TRPM7 channel is also blocked by extracellular Mg^{2+} as well as polyamines like spermine preventing permeation of monovalent cations in a voltage-dependent manner [29].

TRPM7 is a channel which conducts several ion species other than Ca^{2+} and Mg^{2+} . Indeed, it also promotes cellular entry of trace metal cations like Zn^{2+} [30]. Moreover, TRPM7 is able to conduct H^+ under acidic extracellular conditions [31]. TRPM7 currents can be potentiated under specific conditions. For example, extracellular acidosis below pH=6.0 and H^+ accumulation in the plasma membrane vicinity greatly potentiate TRPM7 inward currents [32] whereas intracellular acidosis inhibits MIC currents (IC_{50} at pH=6.3) by interacting with the Mg^{2+} low affinity binding site [33]. TRPM7 channel is also sensitive to osmotic gradients since hypotonicity potentiates TRPM7 currents in conditions with elevated intracellular free- Mg^{2+} and Mg-ATP whereas hypertonicity inhibits TRPM7 current with an IC_{50} of 430 mOsm [34]. Recently, it has been observed that the cleavage of TRPM7 kinase domain under pro-apoptotic conditions potentiates inward current [19] whereas other studies report that the kinase domain deletion decreased channel activity [5, 15, 33].

1.3.1. TRPM7 Current Recordings in Cancer Cells

It is well established that TRPM7 can regulate cancer cell fates through different mechanisms (see chapter 3). TRPM7 mRNA and protein expression were altered in numerous cancers but no data are currently available on correlation between endogenous TRPM7 current recordings and cancer cell fates. However, a correlation was shown between TRPM7 expression, TRPM7-like current densities and cell differentiation and proliferation in hepatocytes [35]. Thus, TRPM7-like currents were larger in proliferating cells when compared to terminally differentiated and quiescent rat hepatocytes. In human retinoblastoma cells, Hanano *et*

al. recorded a TRPM7-like spontaneous cation currents under nystatin-perforated patch-clamp condition [36]. TRPM7-like currents were permeant to Ca^{2+} and Mg^{2+} , and inhibited by intracellular Mg^{2+} (930 μM) and MgATP (8 mM). The channels activated by Mg^{2+} depletion have a unitary conductance of 70 pS in inside-out single channel recordings. TRPM7 silencing with siRNA abolished spontaneous cation current as well as Ca^{2+} influx and cell proliferation. TRPM7-like currents were described by Guilbert *et al.* in human breast cancer MCF-7 cell line and in human breast cancer epithelial primary culture [37]. TRPM7-like currents were induced by depleting intracellular Mg^{2+} in whole cell patch-clamp configuration. Both TRPM7 silencing and intracellular Mg^{2+} (IC_{50} =155 μM) inhibited cation currents in MCF-7 cells. TRPM7 siRNA also decreased intracellular Ca^{2+} levels and cell proliferation. Taken together, these data suggest that TRPM7 current participates to basal Ca^{2+} influx and cell proliferation in retinoblastoma, and MCF-7 cells.

TRPM7-like currents were also recorded in migrating cancer cells. Cation currents were recorded in MDA-MB-231 and MDA-MB-435S human breast cancer cell lines following intracellular Mg^{2+} depletion [38]. TRPM7-like currents were inhibited by intracellular Mg^{2+} in a dose-dependent manner (IC_{50} =837 μM for MDA-MB-231; IC_{50} =2.14 mM for MDA-MB-435S). The currents were also decreased by TRPM7 siRNA, indicating that MIC currents are mostly due to TRPM7 activation. Interestingly, the TRPM7 currents were less sensitive to intracellular Mg^{2+} in MDA-MB-231 and MDA-MB-435S cells than in MCF-7 cells. This difference was not due to a difference in the amino acids sequence of the TRPM7 protein since the TRPM7 sequencing results showed no difference in the pore and C-terminal regions between MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-435S cell lines (personal data, not published). Moreover, TRPM7 silencing had no effect on intracellular Ca^{2+} homeostasis and did not inhibit cell proliferation whereas cell migration was decreased in cells treated with TRPM7 siRNA. This study showed that human breast cancer cell migration is regulated by TRPM7 through its kinase domain and probably not by its channel function. TRPM7 currents were smaller in MDA-MB-231 and MDA-MB-435S cells when compared to MCF-7 cells (Table 1). These data suggest that TRPM7 currents could be larger in proliferative breast cancer cells than in migratory breast cancer cells. This could be explained by the role of TRPM7 in cell proliferation related to Ca^{2+} influx in breast cancer. However, future investigations are needed to explore TRPM7 current densities in other cancer cell types and to establish a correlation between

to establish a correlation between TRPM7 currents and proliferative/migratory phenotype.

TRPM7 currents were also recorded in human pancreatic cancer cell line BxPC-3 [39]. TRPM7 currents were fully inhibited by 850 μM of intracellular Mg^{2+} or by siRNA. TRPM7 regulates intracellular Mg^{2+} homeostasis and the Mg^{2+} -dependent cell migration in BxPC-3 cells. The TRPM7 current-densities recorded in BxPC-3 cells were larger than in breast cancer cell lines (Table 1). However, there is no data available on TRPM7 current densities in other pancreatic cancer cell lines to establish a possible correlation between TRPM7 currents and proliferative phenotype.

Electrophysiological recordings on cancer cells provide also information on the intracellular Mg^{2+} sensitivity of the TRPM7 currents. It is generally accepted that cellular free- $[\text{Mg}^{2+}]$ is between 0.5 and 1.2 mM [40, 41]. Whole-cell patch-clamp recordings indicated that TRPM7 channels are inhibited by intracellular Mg^{2+} in the submillimolar range suggesting that a majority of channels are closed under physiological conditions of intracellular Mg^{2+} . But perforated patch-clamp [36] and manganese-induced quenching of fura-2 fluorescence techniques demonstrate that a fraction of TRPM7 channels is constitutively active at the plasma membrane of cancer cells [38, 39]. This can be explained by the possible role of elevated level of bound Mg^{2+} in carcinogenesis. In a recent study on rat glioma, the cancer tissue and the single infiltrating cancer cells contained elevated levels of bound Mg (\approx 2-fold) than in the adjacent non-cancer tissue [42]. Moreover, recent studies on human colon carcinoma LoVo cell line indicated that free- Mg^{2+} is around 0.3 mM and that TRPM7 expression is inversely correlated to total Mg amount [43]. Future investigations should establish the relation between intracellular Mg^{2+} homeostasis, TRPM7 expression and its constitutive activity in proliferating *versus* migrating/invasive cancer cells.

2. TRPM7 EXPRESSION IN MALIGNANT TISSUES

A growing number of studies investigate TRPM7 expression and its implication in diverse malignancies. Although, TRPM7 mRNA and protein are detected in several cancer cell lines, studies in human cancer samples are more limited. For example, TRPM7 channels are abundantly expressed in human pulmonary adenocarcinoma and in primary cultures of retinoblastoma and glioblastoma cells [36, 44, 45]. Moreover, recent studies detected punctual somatic mutations of TRPM7 in gastric, ovarian [46], breast [46, 47] and colorectal

Table 1. TRPM7 current-densities and sensitivities to intracellular Mg^{2+} in cancer cells.

Cancer cell type	Endogenous TRPM7 Current-density	Inhibition by free- $[Mg^{2+}]_i$	Related to	References
RBL (Retinoblastoma)	NA	930 μM	Ca^{2+} -dependent cell proliferation	[36]
MCF-7 (Breast)	16 pA/pF	$IC_{50}=155 \mu M$	Ca^{2+} -dependent cell proliferation	[37]
hBCE (Breast)	12 pA/pF	680 μM	NA	[37]
MDA-MB-231 (Breast)	5 pA/pF	$IC_{50}=837 \mu M$	Kinase-dependent cell migration	[38]
MDA-MB-435S (Breast)	10 pA/pF	$IC_{50}=2.14 mM$	Kinase-dependent cell migration	[38]
BxPC-3 (Pancreas)	32 pA/pF	850 μM	Mg^{2+} -dependent cell migration	[39]

cancers [48]. Interestingly, mutations of TRPM7 are correlated with elevated risk of apparition of colorectal neoplasia [48], and reduced or elevated risk of breast cancer according to single nucleotide polymorphisms of *trpm7* gene [47].

With apparition and development of transcriptomic analysis, micro-arrays experiments were used to compare TRPM7 mRNA expression in healthy and cancer human tissues. TRPM7 is overexpressed in some cancers such as bladder, colon, head and neck, and prostate cancers whereas, TRPM7 is downregulated in cervix, kidney, rectum and thyroid cancers [49]. Moreover, in thyroid cancer, it seems that alterations of TRPM7 expression may be correlated with cancer incidence and risk [49]. Other studies using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), Western Blot or immunohistochemistry experiments revealed overexpression of TRPM7 in prostatic and nasopharyngeal cancers, in glioblastoma and also in pancreatic neoplasms and adenocarcinoma [50-55].

Finally, in a few but increasing number of publications, TRPM7 expression pattern is correlated with clinical parameters (Table 1). In ovarian and nasopharyngeal carcinoma, TRPM7 expression is inversely associated with patient survival [56, 57]. Moreover, in nasopharyngeal carcinoma, there is a higher expression of TRPM7 in metastatic tumors compared to non-metastatic tumors, and TRPM7 overexpression is correlated with lymphatic metastasis apparition and tumor stage, reflecting invasiveness and aggressiveness, respectively. Importantly, using multivariate analysis, the authors highlighted that TRPM7 is an independent prognostic marker of nasopharyngeal cancer progression (compared with other parameters such as age, gender, grade, distant and lymphatic metastasis) [57].

In pancreatic ductal adenocarcinoma and by using immunohistochemistry experiments, TRPM7 protein overexpression was shown to be correlated with tumor grade, and inversely correlated to patient survival [39]. Another study confirmed that TRPM7 expression is associated to size and grade of primary tumors, and revealed a higher TRPM7 staining in metastatic tumors than in non-metastatic ones [53]. TRPM7 is linked to aggressiveness and invasiveness and could be considered as a marker of poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. The same results were observed in breast ductal adenocarcinoma. Indeed, in estrogen receptor positive (ER^+) breast cancers, TRPM7 is expressed in primary cultures of cancer epithelial cells, and overexpressed in cancer tissues compared to non-cancer ones [37]. Moreover, this overexpression is correlated with tumor size and grade, and with Ki67 mitotic marker, suggesting that TRPM7 could be a proliferative marker in non-invasive hormone-dependent breast cancers [37, 58]. Analysis of a larger cohort of breast cancer tumors using micro-array experiments confirmed the positive correlation between TRPM7 overexpression and tumor grade, and revealed an inverse correlation with patient survival. Furthermore, multivariate analysis showed that TRPM7 is a strong independent prognosis marker of breast cancer recurrence and metastasis occurrence [59]. Moreover, TRPM7 mRNA level is higher in metastatic tumors compared to primary tumors and in invasive cancers compared to normal breast tissues [60]. In ER^- invasive breast cancer, TRPM7 protein expression is higher in invasive cells from primary tumors and invaded lymph nodes than in non-invasive cancer cells [38]. Finally, the expression of TRPM7 is increased in infiltrating ductal carcinoma samples with microcalcifications when compared with age-matched controls without calcification or cancer [61]. Altogether, the results

demonstrate that TRPM7 channel could be considered as a novel strong marker of breast cancer progression and metastasis, particularly in invasive triple negative breast cancers.

A very recent study performed in glioblastoma showed that TRPM7 expression is positively associated with patient survival, which means that TRPM7 could be a marker of good prognosis in glioblastoma [55]. Nevertheless, the authors did not perform a classical Kaplan-Meier analysis, but observed a higher expression of these TRP channels in patients with survival time > 12 months compared to patients with survival time < 12 months. Moreover, this study is in contradiction with others performed in three different glioblastoma cell lines showing that inhibition of TRPM7 channel using pharmacological agents or siRNA decreases cell migration and invasion [45, 62-64].

These studies on human tissues highlighted the major clinical relevance of TRPM7 expression in pancreatic, breast, nasopharyngeal and ovarian cancer development (Table 2). Indeed, in these cancers, TRPM7 expression is associated with aggressiveness and invasiveness and inversely correlated to patient survival, suggesting that TRPM7 may be a potential marker of poor prognosis.

3. TRPM7 ROLES IN CELL MODELS

TRPM7 has a ubiquitous distribution pattern in human tissues and cell lines [4, 5]. Furthermore, screening of human tissues using quantitative RT-PCR approach indicates that TRPM7 is widely distributed in the central nervous system and periphery, with highest expression in heart, pituitary, bone and adipose tissue [65]. Interestingly, overexpression of TRPM7 in HEK-293 cells induces the transcription alteration of 951 genes [66]. These data suggest an important role of TRPM7 in tissue integrity, development and cell functions. TRPM7 roles in cell physiology have been extensively described (for recent reviews, see [67-70]).

In non-cancer cells, TRPM7 is required for cellular and tissue Mg^{2+} homeostasis [17, 71] and cell survival [72-75]. TRPM7 is also implicated in cell mortality since it has been shown to regulate apoptosis in T-cells [19], fibroblasts [76], hepatic stellate cells [77], and neurons [78]. Furthermore, recent data demonstrate that TRPM7 activation induces neuronal cell death [79] and HEK293 necroptosis [80] by promoting cytosolic Ca^{2+} overload. Heterologous expression of TRPM7 in HEK293 cells under nutrient-rich conditions increases basal autophagy through constitutive Ca^{2+} entry, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase β and AMP-

activated protein kinase pathways [81]. TRPM7 is essential for early embryonic development [82, 83] and gastrulation phase [84]. TRPM7 has been demonstrated to be involved in the development of organs including thymus [82], bone [85-88], exocrine pancreas [54], fat tissue [89], and myocardium [90]. Interestingly, it has been shown that TRPM7 participates to Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) [91]. EMT is essential during embryogenesis since mesenchymal cells migrate and disseminate to various parts of the embryo, where they participate to the organ development. An important role of TRPM7 in normal cells is the regulation of cellular adhesion and migration. Indeed, TRPM7 controls cell adhesion by interacting with calpain [92] and the channel regulates polarized migration in fibroblasts through Mg^{2+} and Ca^{2+} signaling [93, 94]. Finally, Patients with variants in *trpm7* display macrothrombocytopenia with different clinical outcomes and symptoms due to the location of the mutations [95]. Single point mutations impair TRPM7 channel function leading to Mg^{2+} homeostasis deregulation and secondary atrial fibrillation in patients with thrombocytopenia [95].

Ca^{2+} signaling has been widely described in cancer cells [96, 97]. Changes in cytosolic Ca^{2+} levels due to the coordinate activity of Ca^{2+} transporters and binding proteins ultimately lead to activation of Ca^{2+} -dependent transcription factors and impaired cell proliferation, migration and invasion. While Ca^{2+} is considered as an essential second messenger involved in most signaling pathways, the role of Mg^{2+} in cancer is still under debate despite evidences indicating that Mg^{2+} can act as a second messenger [98].

Mg^{2+} is the second most abundant intracellular cation with a total concentration range from ~10 to ~30 mM. Most of intracellular Mg^{2+} is bound to ribosomes, polynucleotides and ATP. Thus, the free- Mg^{2+} concentration is within 0.5-1.2 mM in the cytosol. Consequently, the electrochemical gradient for Mg^{2+} is low as free-cation concentrations in the intra- and extracellular compartments are close in contrast to Ca^{2+} indicating that Mg^{2+} influx is dependent on the cell metabolic activity and intracellular Mg^{2+} availability. However, Mg^{2+} is a versatile cation that is involved as a co-enzymatic factor in numerous metabolic and biochemical reactions within the cell [40]. Indeed, one of the cancer hallmarks is the reprogramming of energy metabolism in cancer cells by limiting their energy metabolism largely to glycolysis, leading to a state that has been termed "aerobic glycolysis" [99]. Mg^{2+} is required as cofactor for most enzymes involved in glycolysis and also for protein synthesis. Thus, it is evident

Table 2. Expression of TRPM7 in human cancer tissues - correlation with clinical parameters.

Cancer	Correlation between overexpression and clinical parameters	Number of cancer tissue samples	References
Pancreatic adenocarcinoma	Overexpression Correlation with grade and size Correlation with metastatic tumors Inverse correlation with survival	18-5-310 18-282 11 18	[39, 53, 54] [39, 53] [53] [39]
Breast carcinoma	Overexpression Correlation with grade Correlation with mitotic potential Correlation with occurrence of metastasis Correlation with presence of invasive cells in breast tissues and lymph nodes Correlation with presence of micro calcifications Inverse correlation with survival	59-26-512-28-438-138 59-26-512 59-26 144-438 28 138 368	[37, 38, 58-61] [37, 58, 59] [37, 58] [59, 60] [38, 60] [61] [59]
Nasopharyngeal carcinoma	Overexpression Correlation with clinical stage Correlation with metastatic tumors Inverse correlation with survival	3-206 206 206	[52, 57] [57] [57]
Ovarian carcinoma	Overexpression Inverse correlation with survival	138 138	[56] [56]

that Mg^{2+} homeostasis should play a key role in cancer cells abilities including sustained proliferation, and metastatic processes such as migration, and invasion as recently reviewed by Trapani *et al.* [100]. There are many plasma membrane transporters allowing Mg^{2+} influx [40, 41] but the dual function of TRPM7 as both Ca^{2+}/Mg^{2+} channel and kinase confers to this protein a key role of “master and commander” in controlling cancer cells fates by modulating Ca^{2+} and/or Mg^{2+} signaling and by phosphorylating intracellular substrates [100].

3.1. Cell Proliferation

The role of TRPM7 in proliferation has been examined in numerous cancer cell types. However, the mechanisms by which TRPM7 is involved remains not yet clearly determined. Ca^{2+} entry through this channel has been demonstrated to play a critical role in cell proliferation. Indeed, pharmacological inhibition and silencing of TRPM7 decreases TRPM7-mediated Ca^{2+} entry, delays the G1/S cell cycle progression and reduces retinoblastoma cells proliferation [36]. In 2007, another study showed that Ca^{2+} influx through TRPM7 participates to proliferation of pharyngeal and thyroid carcinoma cells [101]. TRPM7 regulates also pharyngeal cells proliferation by regulating cell cycle progression and retinoblastoma protein (Rb) activation [102]. Recently, it has been demonstrated that TRPM7 mediates pharyngeal cell proliferation *via* activating STAT3 signaling pathway [52]. Finally, studies on ER⁺

breast and prostate cancer cell lines suggest that Ca^{2+} influx associated with TRPM7 are critical for cancer cell proliferation [37, 50, 51].

However, it is important to note that endogenous TRPM7 regulates basal Ca^{2+} entry in retinoblastoma, head and neck and breast cancer cells, whereas Ca^{2+} influx is stimulated by cholesterol, external Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio increase or TRPM7 overexpression in prostate cancer cells.

TRPM7 regulates also cell proliferation by regulating Mg^{2+} homeostasis. Indeed, in gastric adenocarcinoma cell line AGS, external Mg^{2+} supplementation restores proliferation of TRPM7 deficient cells [103]. The same results were obtained in Panc-1 and BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cell lines [54]. However, no Mg^{2+} influx through TRPM7 was recorded in these studies.

Studies on the TRPM7-dependent signaling pathways have emerged. Thus, pharmacological blockers such as carvacrol, as well as knockdown of TRPM7 decrease proliferation of U87 cell line and inhibit PI3K/Akt and MEK/MAPK signaling pathways [104]. The same results were found in another glioblastoma cell line U251 using a new TRPM7 channel blocker, the Xyloketal B, extract from a mangrove fungus *Xylaria sp.* from the South China Sea [63]. Akt signaling pathway has also been shown to be involved in TRPM7-mediated proliferation in ovarian cancer cell lines, as well as Src and p38 [105]. Another study sug-

gests the involvement of TRPM7 in the growth of glioblastoma stem cells derived from A172 cell line, through activation of JAK2/STAT3 and/or Notch signaling pathways [64]. It was also shown that TRPM7 contributes to proliferation of the neuroblastoma cell line SHEP-21N, a clone derived from the SHEP-2 neuroblastoma cell line in which the oncogene protein N-Myc is constitutively expressed. The N-Myc-induced cell growth as well as MagNum current are suppressed by downregulation of TRPM7, TRPM6 and heteromeric TRPM7/TRPM6 channels [106].

To summarize, both TRPM7 blockers and silencing strongly affect cancer cell proliferation by disrupting cell cycle and proliferative signaling pathways indicating that TRPM7 is involved in cancer cell growth. External Mg^{2+} is able to restore reduced proliferation induced by TRPM7 silencing in gastric and pancreatic cancer cells without evidence for a role of TRPM7 in Mg^{2+} influx. On the other hand, TRPM7 regulates basal Ca^{2+} entry and cytosolic Ca^{2+} levels leading to sustained proliferation in retinoblastoma, head and neck and breast cancer cells.

3.2. Stimulated Cell Migration

The first experiment showing the role of TRPM7 in cancer cell migration has been done in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. TRPM7 kinase domain regulates cell motility. Indeed, Myosin IIA Heavy Chain is a substrate for TRPM7 phosphotransferase activity leading to actomyosin complex stabilization and transformation of focal adhesion into podosomes [21, 22, 107]. Interestingly, TRPM7 stimulation by bradykinin or TRPM7 overexpression leads to Ca^{2+} influx and interaction between TRPM7 kinase domain and Myosin IIA Heavy Chain. TRPM7 implication in cancer cell migration was further confirmed in nasopharynx cells [108]. In this study, TRPM7 stimulation by bradykinin or TRPM7 overexpression enhances cell migration through Calcium-Induced Calcium Release (CICR) mechanism. Indeed, sustained Ca^{2+} entry through TRPM7 channels induces ryanodine receptors activation and Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum (ER) stores. Moreover, Epidermal Growth Factor (EGF) incubation enhances lung cancer cell migration by increasing TRPM7 expression and MIC current [44]. In prostate cancer cells, cholesterol enhances migration through TRPM7 activation and Ca^{2+} entry [51]. All these data show that both activation and overexpression of TRPM7 lead to Ca^{2+} signaling changes and enhanced cell migration.

3.3. Basal Cell Migration and Invasion

TRPM7 silencing dramatically inhibits basal cell migration and basal intracellular Mg^{2+} levels in pancreatic ductal adenocarcinoma cells without affecting basal intracellular Ca^{2+} level [39]. Interestingly, inhibition of pancreatic cancer cell migration induced by TRPM7 silencing can be rescued by supplementation of media with 1 mM Mg^{2+} , suggesting that TRPM7 regulates pancreatic cancer cell motility through Mg^{2+} rather than Ca^{2+} influx. Moreover, in ER⁻ breast cancer, TRPM7 silencing inhibits cell migration without affecting cation homeostasis [38]. Importantly, heterologous expression of kinase-deleted TRPM7 mutant decreases cell migration and Myosin Heavy Chain phosphorylation indicating that TRPM7 kinase domain is required for ER⁻ breast cancer cells migration [38].

First evidences for implication of TRPM7 in cancer cell invasion and metastasis formation were recently highlighted in ER⁻ breast cancer [59] and in neuroblastoma [109]. Importantly, TRPM7 promotes invadosome formation and actomyosin contraction independently of Ca^{2+} signaling in neuroblastoma cells [109]. Moreover, TRPM7 is required to maintain progenitor-like features promoting neuroblastoma progression and metastasis [110]. In pancreatic cancer cell lines, it has been recently shown that TRPM7 regulates cell invasion in response to fetal bovine serum used as chemoattractant [53]. Finally, TRPM7 regulates metastasis formation and dissemination in xenograft models [59]. Interestingly, TRPM7 is also involved in EMT transition [91] which is the first stage of metastasis cascade [111]. Indeed, TRPM7 silencing or blocking reduce vimentin induction independently of global cytosolic Ca^{2+} levels changes following EGF stimulation in MDA-MB-468 breast cancer cells [91].

Taken together, these data indicate that TRPM7 regulates stimulated migration (by BK, EGF or cholesterol) through Ca^{2+} signaling whereas the channel regulates basal cancer migration and invasion independently of Ca^{2+} signaling. Thus, recent data demonstrate that TRPM7 regulates metastatic processes by promoting constitutive Mg^{2+} influx and through its kinase domain. Since TRPM7 kinase domain is positively regulated by internal Mg^{2+} , it is tempting to speculate that TRPM7 is constitutively active at the plasma membrane of migratory cancer cells leading to localized sustained Mg^{2+} influx that enhances phosphotransferase activity and cytoskeleton remodeling. Since driving force for Mg^{2+} entry is weak, future investigations are definitely needed to better determine the relation be-

tween Mg^{2+} signaling and TRPM7 phosphotransferase activity in metastatic cell migration and invasion.

4. TRPM7 PHARMACOLOGICAL MODULATION AND POTENTIAL THERAPEUTIC INTEREST

Recent studies on cancer cell lines demonstrate that TRPM7 channels regulate numerous oncologic cellular processes such as proliferation, migration and invasion. Moreover, it has been recently shown that TRPM7 regulates breast cancer metastasis formation and dissemination in a mouse model of xenograft [59]. Consequently, we can speculate that TRPM7 could be used as a therapeutic target in invasive cancers in order to reduce cancer progression and metastasis formation.

Nevertheless, in contrast to other channels like K^+ channels, there is a lack of specific pharmacological tools for targeting TRP channels [112]. Recent advances on TRPM7 blockers and activators have been extensively reviewed by Chubanov *et al.* [113]. To summarize, the most potent TRPM7 blockers are NS8593, which is also a small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (K_{Ca} 2.1-2.3) blocker, and waixenicin A, a natural terpenoid from *Sarcothelia edmonsoni*.

Waixenicin A inhibits fluorescence quench of intracellular fura-2 by Mn^{2+} ions with an IC_{50} of 12 μM and decreased TRPM7 currents with an IC_{50} of 7 μM in HEK293 cells overexpressing murine TRPM7 [114]. Addition of intracellular Mg^{2+} (up to 700 μM) induces a shift in the dose-response curve with an IC_{50} of 16 nM. Importantly, elevated intracellular Mg^{2+} levels potentiate the blocking effect of waixenicin A on TRPM7 channels. Moreover, waixenicin A seems specific to TRPM7 channels since this blocker has no effect on other ion channels such as CRAC, TRPM2, TRPM4 and TRPM6 [114]. Waixenicin A has been also used to inhibit Jurkat T cell lymphoma and RBL1 retinoblastoma cells proliferation with an IC_{50} in the low micromolar range [114]. In other cancer cells, waixenicin A has been shown to inhibit TRPM7-related proliferation, migration or invasion. For example, low micromolar concentration of waixenicin A inhibits invadosome formation in N1E-115 neuroblastoma cells [109]. Thus, waixenicin A is a very promising TRPM7 channel blocker that is potent at low nanomolar range, in physiological conditions of intracellular Mg^{2+} . At a molecular point of view, waixenicin A acts intracellularly by interacting with the Mg^{2+} binding site localized at the Lys-1648 within the kinase domain [114]. According to Zierler *et al.*, waixenicin A and Mg^{2+} act

synergistically to block TRPM7 because, under physiological Mg^{2+} conditions, TRPM7 is in a conformational state that allows waixenicin A to bind with high affinity [114].

NS8593 has been used to block TRPM7 leading to reduced vimentin protein induction in MDA-MB-468 breast cancer cells [91]. NS8593 reversely blocks TRPM7 currents by targeting the channel gating in HEK293 cells transiently transfected with TRPM7 cDNA [115]. Indeed, NS8593 blocks directly and reversibly TRPM7 channels through a molecular interaction mediated by the pore-forming loop of TRPM7 and the imidazole ring of NS8593 [115]. The blocking effect of NS8593 is dependent on intracellular Mg^{2+} concentration since IC_{50} was 1.6 μM for cytosolic free-Mg, and 5.9 μM for cytosolic 300 μM Mg^{2+} [115].

Other molecules were used to block TRPM7 channels but in the high micromolar range. Carvacrol was initially characterized as a blocker of TRPM7 channels in HEK-293 overexpressing TRPM7 and in CA3-CA1 hippocampal neurons, since it inhibits TRPM7 currents with an IC_{50} of 306 μM [116]. In U87 glioblastoma cells, carvacrol at 500 μM inhibits TRPM7 currents, cell proliferation (IC_{50} of 561 μM), cell migration, invasion and metalloproteinase 2 (MMP-2) expression [104]. However, it is known that carvacrol is not specific for TRPM7 channels since it inhibits TRPML channels and it activates thermoTRP channels such as TRPV3 and TRPA1 [116]. It has been shown that carvacrol induced cell death in human oral cancer cells by altering Ca^{2+} levels through PLC modulation [117]. Moreover, carvacrol protects against traumatic neuronal injury by inhibiting the induction of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) [118]. PLC and nNOS were shown to act upstream from TRPM7 channels [119, 120]. Taken together, these data suggest that carvacrol may modulate TRPM7 channels in an indirect manner.

Recently, two natural products, ginsenoside Rd and xyloketal B, have been used in the concentration range of high micromolar to inhibit TRPM7-dependent proliferation and migration in cancer cells [63, 121]. Ginsenoside Rd, derived from ginseng, inhibits cell proliferation with an IC_{50} of 131 μM in AGS gastric cancer cells and with an IC_{50} of 154 μM in MCF-7 breast cancer cells without affecting HEK-293 proliferation. Moreover, TRPM7 currents were reduced by 300 μM of ginsenoside Rd in both AGS and MCF-7 cells. Xyloketal B is a marine compound isolated from mangrove fungus *Xylaria* sp. Xyloketal B decreases U251 glioblastoma cell proliferation with an IC_{50} of 287 μM [63]. Furthermore, Xyloketal B at 300 μM also de-

creases U251 cell migration and it blocks TRPM7 currents in HEK-293 overexpressing TRPM7 [63].

To summarize, waixenicin A and NS8593 interact directly with the channel in a Mg^{2+} -dependent manner. On the other hand, carvacrol modulating activity seems indirect since it also modulates PLC and nNOS that act downstream from TRPM7 channels.

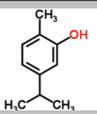
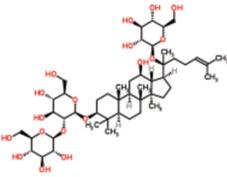
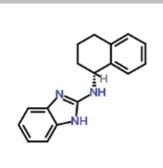
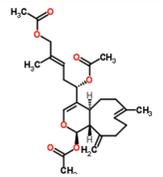
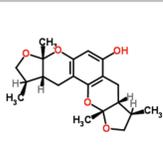
The effects of these TRPM7 pharmacological blockers are summarized in Table 3.

TRPM7 agonists have been also recently identified [123]. Naltriben, a phenanthrene opioid, activates TRPM7 channels under physiological conditions of intracellular Mg^{2+} and also under low PIP_2 . Naltriben induces TRPM7-mediated Ca^{2+} entry in a concentration-dependent manner with an EC_{50} value of 20.7 ± 2.6 μM [123]. Here, the mechanism of action is to counteract the inhibitory effect of intracellular Mg^{2+} on TRPM7 gating [123]. Neither the TRPM7 kinase nor the TRPM7 pore domain are involved in the stimula-

tion of TRPM7 gating by naltriben, whereas the TRP domain is required for this mechanism. Mibefradil and NNC 50-0396, two benzimidazole, have been also identified as TRPM7 agonists [124]. In contrast to naltriben, mibefradil activates TRPM7 in an intracellular Mg^{2+} -dependent mode suggesting that the TRPM7 channels can be activated by at least two types of agonists [124]. Recently, naltriben has been used to potentiate G551D-CFTR mutant function through TRPM7 activation in cystic fibrosis disorder [125].

In our opinion, TRPM7 channels are important potential targets in cancer cells. NS8593 and waixenicin A, act on channel function in a Mg^{2+} -dependent manner. These two blockers decrease both TRPM7-dependent Ca^{2+} - and Mg^{2+} influxes. However, TRPM7 channels are ubiquitously expressed and they are involved in numerous physiological functions by maintaining cytosolic Ca^{2+} and Mg^{2+} levels. Thus, using TRPM7 blockers to target the cancer cells could also hit the healthy cells. It is important to develop new

Table 3. Effects of TRPM7 blockers on cancer cells fates.

Product name	Molecular formula	Doses used (μM)	Cellular model	Cell fate	References
Carvacrol		561 (IC_{50})	U87	Proliferation Migration Invasion	[104]
Ginsenoside Rd		131 & 154 (IC_{50})	AGS & MCF-7	Proliferation	[121]
NS8593		1, 10 & 30	MDA-MB468	EMT	[91]
Waixenicin A		3.2 (IC_{50}) 0.84 (IC_{50}) 30 & 50	Jurkat T & RBL1 N1E-115 AGS & MCF-7	Proliferation Invasion Proliferation	[114] [109] [122]
Xyloketal B		287 (IC_{50})	U251	Proliferation Migration	[63]

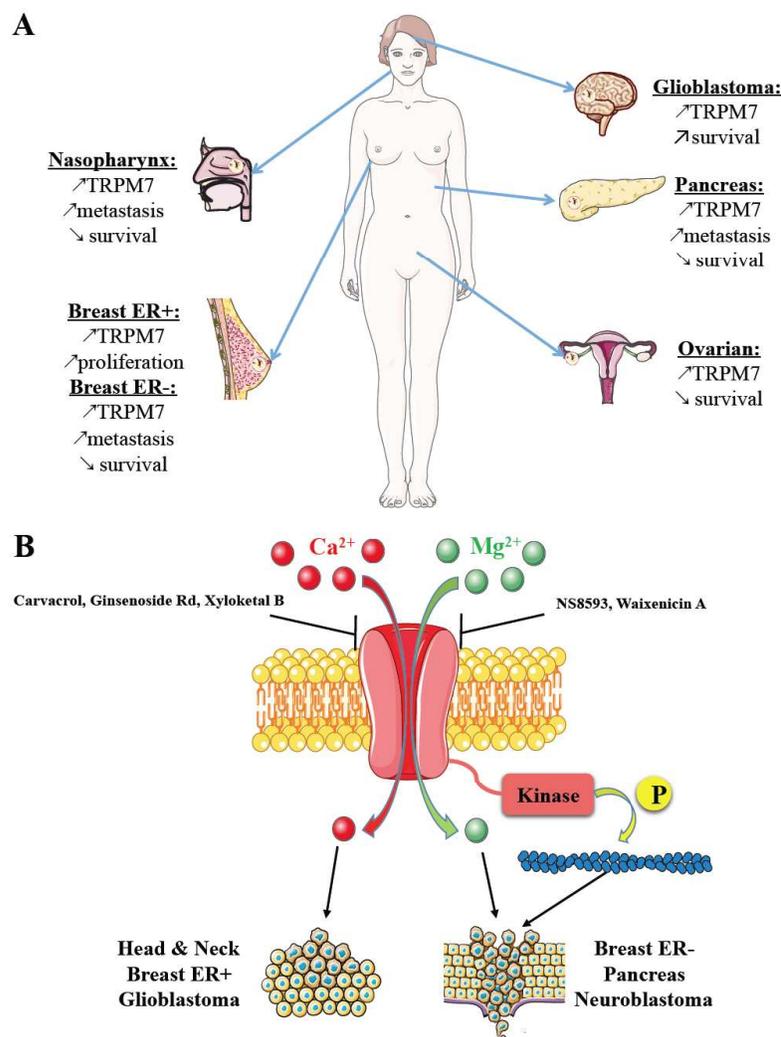


Fig. (2). A. TRPM7 expression and correlation with clinical parameters in human cancers by localization. B. TRPM7 promotes Ca^{2+} basal entry leading to sustained cell proliferation in head and neck, breast ER+ cancers and glioblastoma. On the other hand, TRPM7 regulates metastatic processes including cell migration and invasion in a Ca^{2+} -independent manner in breast ER-, pancreas and neuroblastoma by promoting Mg^{2+} basal entry and enhanced kinase activity. TRPM7 is blocked by carvacrol, ginsenoside Rd, NS8593, waixenicin A and xyloketal B. Among these blockers, NS8593 and waixenicin A inhibit TRPM7 activity in an intracellular Mg^{2+} -dependent manner.

molecules that will target TRPM7 only in cancer tissues. For example, the TRPM7 kinase function seems specifically involved in metastatic processes. Studies on TRPM7 mutant mice show that the deletion of the kinase domain dramatically disrupts Mg^{2+} homeostasis [71] whereas kinase function inhibition by point mutation does not impair channel activity, Mg^{2+} homeostasis and development in kinase inactive mutant mice [126, 127]. Thus, we can speculate that targeting the TRPM7 kinase function would inhibit specifically cancer cell migration and or invasion with no or only moderate side-effect on healthy cells. To date, only rottlerin has been used to inhibit the TRPM7 kinase function [12]. Rottlerin is a protein kinase inhibitor but it is also able to promote vasodilatation through BK_{Ca} opening [128].

Future research in experimental oncology will be to identify molecules that target the TRPM7 kinase domain to selectively block this function in metastatic processes *in vitro* and *in vivo*.

CONCLUSION

TRPM7 channels are aberrantly expressed in numerous malignancies (Table 2 and Fig. 2A) and recent data on cancer cell lines demonstrate that TRPM7 regulates cancer cell fates by different mechanisms. Thus, TRPM7 channel allows $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and trace metal entries at physiological membrane potentials. Moreover, TRPM7 C-terminal kinase domain is able to recognize and phosphorylate cytosolic substrates such as MLC or MHC. In cancer cells, there is growing evidence that

endogenous, constitutively activated TRPM7 channels regulate proliferation and viability processes through Ca^{2+} influx whereas Mg^{2+} influx and kinase function seem to be involved in migratory and invasive processes (Fig. 2B). We suggest that TRPM7 channels continuously conduct $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ leading to locally sustained cytosolic $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ levels and enhanced cancer cell hallmarks depending of cancer cell type or protein partner availability in the channel vicinity. Future efforts will try to decipher the molecular mechanisms involving TRPM7 channels in cancer cell fates. Additionally, while promising drugs targeting TRPM7 channel function are available, characterization of pharmacological compounds directed against the kinase domain will greatly help to discriminate channel function to kinase function in cancer cells.

LIST OF ABBREVIATIONS

BCR	=	B-Cell Receptor
BK	=	Bradykinin
CC	=	Coiled-Coil
CICR	=	Calcium-Induced Calcium Release
eEF2K	=	eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase
EMT	=	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER	=	Estrogen Receptor
ERK	=	Extracellular signal-Regulated Kinase
MagNum	=	Magnesium Nucleotide-regulated Metal ion
MHC	=	Myosin Heavy Chain
MHCK	=	Myosin Heavy Chain Kinase
MHD	=	Melastatin Homology Domain
MIC	=	Magnesium-Inhibited Cation
MLC	=	Myosin Light Chain
nNOS	=	Neuronal Nitric Oxide Synthase
PIP2	=	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC	=	Phospholipase C
Rb	=	Retinoblastoma protein
TRP	=	Transient Receptor Potential
TRPM7	=	Transient Receptor Potential Melastatin-related 7

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

MP, MM and AV were recipient of founding from the Conseil Régional de Picardie. This work was supported by FEDER, la Ligue Contre le Cancer (Septentrion) and la SFR CAP-Santé (FED 4231).

REFERENCES

- [1] Wu, L.J.; Sweet, T.B.; Clapham, D.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.*, **2010**, *62*(3), 381-404.
- [2] Montell, C. Mg^{2+} homeostasis: the Mg^{2+} nificent TRPM channels. *Curr. Biol.*, **2003**, *13*(20), R799-R801.
- [3] Ryazanov, A.G.; Pavur, K.S.; Dorovkov, M.V. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr. Biol.*, **1999**, *9*(2), R43-R45.
- [4] Nadler, M.J.; Hermosura, M.C.; Inabe, K.; Perraud, A.L.; Zhu, Q.; Stokes, A.J.; Kurosaki, T.; Kinet, J.P.; Penner, R.; Scharenberg, A.M.; Fleig, A. LTRPC7 is a Mg^{2+} -ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, **2001**, *411*(6837), 590-595.
- [5] Runnels, L.W.; Yue, L.; Clapham, D.E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, **2001**, *291*(5506), 1043-1047.
- [6] Fleig, A.; Chubanov, V. Trpm7. *Handbook Exp. Pharmacol.*, **2014**, *222*, 521-546.
- [7] Chubanov, V.; Waldegger, S.; Mederos y Schnitzler, M.; Vitzthum, H.; Sassen, M.C.; Seyberth, H.W.; 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. USA*, **2004**, *101*(9), 2894-2899.
- [8] Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, **2007**, *76*, 387-417.
- [9] Fujiwara, Y.; Minor, D.L., Jr. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J. Mol. Biol.*, **2008**, *383*(4), 854-870.
- [10] Ryazanov, A.G. Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. *FEBS Lett.*, **2002**, *514*(1), 26-29.
- [11] Ryazanov, A.G.; Ward, M.D.; Mendola, C.E.; Pavur, K.S.; Dorovkov, M.V.; Wiedmann, M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Parmer, T.G.; Prostko, C.R.; Germino, F.J.; Hait, W.N. Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*(10), 4884-4889.
- [12] Ryazanova, L.V.; Dorovkov, M.V.; Ansari, A.; Ryazanov, A.G. Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(5), 3708-3716.
- [13] Yamaguchi, H.; Matsushita, M.; Nairn, A.C.; Kuriyan, J. Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol. Cell*, **2001**, *7*(5), 1047-1057.
- [14] Clark, K. Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PLoS One*, **2008**, *3*(3), e1876.
- [15] Matsushita, M.; Kozak, J.A.; Shimizu, Y.; McLachlin, D.T.; Yamaguchi, H.; Wei, F.Y.; Tomizawa, K.; Matsui, H.; Chait, B.T.; Cahalan, M.D.; Nairn, A.C. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*(21), 20793-20803.
- [16] Schmitz, C.; Dorovkov, M.V.; Zhao, X.; Davenport, B.J.; Ryazanov, A.G.; Perraud, A.L. The channel kinases

- TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*(45), 37763-37771.
- [17] Schmitz, C.; Perraud, A.L.; Johnson, C.O.; Inabe, K.; Smith, M.K.; Penner, R.; Kurosaki, T.; Fleig, A.; Scharenberg, A.M. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*, **2003**, *114*(2), 191-200.
- [18] Demeuse, P.; Penner, R.; Fleig, A. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *J. Gen. Physiol.*, **2006**, *127*(4), 421-434.
- [19] Desai, B.N.; Krapivinsky, G.; Navarro, B.; Krapivinsky, L.; Carter, B.C.; Febvay, S.; Dellling, M.; Penumaka, A.; Ramsey, I.S.; Manasian, Y.; Clapham, D.E. Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis. *Dev. Cell*, **2012**, *22*(6), 1149-1162.
- [20] Deason-Towne, F.; Perraud, A.L.; 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**, *24*(11), 2070-2075.
- [21] Clark, K.; Langeslag, M.; van Leeuwen, B.; Ran, L.; Ryazanov, A.G.; Figdor, C.G.; Moolenaar, W.H.; Jalink, K.; van Leeuwen, F.N. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J.*, **2006**, *25*(2), 290-301.
- [22] Clark, K.; Middelbeek, J.; Lasonder, E.; Dulyaninova, N.G.; Morrice, N.A.; Ryazanov, A.G.; Bresnick, A.R.; Figdor, C.G.; van Leeuwen, F.N. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *J. Mol. Biol.*, **2008**, *378*(4), 790-803.
- [23] Dorovkov, M.V.; Ryazanov, A.G. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(49), 50643-50646.
- [24] Dorovkov, M.V.; Kostyukova, A.S.; Ryazanov, A.G. Phosphorylation of annexin A1 by TRPM7 kinase: a switch regulating the induction of an α -helix. *Biochemistry*, **2011**, *50*(12), 2187-2193.
- [25] Perraud, A.L.; Zhao, X.; Ryazanov, A.G.; Schmitz, C. The channel-kinase TRPM7 regulates phosphorylation of the translational factor eEF2 via eEF2-k. *Cell. Signal.*, **2011**, *23*(3), 586-593.
- [26] Krapivinsky, G.; Krapivinsky, L.; Manasian, Y.; Clapham, D.E. The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell*, **2014**, *157*(5), 1061-1072.
- [27] Kozak, J.A.; Kerschbaum, H.H.; Cahalan, M.D. Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J. Gen. Physiol.*, **2002**, *120*(2), 221-235.
- [28] Chokshi, R.; Matsushita, M.; Kozak, J.A. Sensitivity of TRPM7 channels to Mg²⁺ characterized in cell-free patches of Jurkat T lymphocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2012**, *302*(11), C1642-C1651.
- [29] Kerschbaum, H.H.; Kozak, J.A.; Cahalan, M.D. Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores. *Biophys. J.*, **2003**, *84*(4), 2293-2305.
- [30] Monteilh-Zoller, M.K.; Hermosura, M.C.; Nadler, M.J.; Scharenberg, A.M.; Penner, R.; Fleig, A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J. Gen. Physiol.*, **2003**, *121*(1), 49-60.
- [31] Numata, T.; Okada, Y. Proton conductivity through the human TRPM7 channel and its molecular determinants. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*(22), 15097-15103.
- [32] Jiang, J.; Li, M.; Yue, L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J. Gen. Physiol.*, **2005**, *126*(2), 137-150.
- [33] Chokshi, R.; Matsushita, M.; Kozak, J.A. Detailed examination of Mg²⁺ and pH sensitivity of human TRPM7 channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2012**, *302*(7), C1004-C1011.
- [34] Bessac, B.F.; Fleig, A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J. Physiol.*, **2007**, *582*(Pt 3), 1073-1086.
- [35] Lam, D.H.; Grant, C.E.; Hill, C.E. Differential expression of TRPM7 in rat hepatoma and embryonic and adult hepatocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **2012**, *90*(4), 435-444.
- [36] Hanano, T.; Hara, Y.; Shi, J.; Morita, H.; Umebayashi, 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**, *95*(4), 403-419.
- [37] 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.*, **2009**, *297*(3), C493-C502.
- [38] Guilbert, A.; Gautier, M.; Dhennin-Duthille, I.; Rybarczyk, P.; Sahni, J.; Sevestre, H.; Scharenberg, A.M.; 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**, *49*(17), 3694-3707.
- [39] Rybarczyk, P.; Gautier, M.; Hague, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chatelain, D.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F.; Regimbeau, J.M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. 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), E851-E861.
- [40] de Baaij, J.H.; Hoenderop, J.G.; Bindels, R.J. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol. Rev.*, **2015**, *95*(1), 1-46.
- [41] Romani, A.M. Cellular magnesium homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, *512*(1), 1-23.
- [42] Chandra, S.; Parker, D.J.; Barth, R.F.; Pannullo, S.C. 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**, *127*(1), 33-41.
- [43] Castiglioni, S.; Cazzaniga, A.; Trapani, V.; Cappadone, C.; Farruggia, G.; Merolle, L.; Wolf, F.I.; Iotti, S.; Maier, J.A. Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 16538.
- [44] 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*(6), 559-568.
- [45] Leng, T.D.; Li, M.H.; Shen, J.F.; Liu, M.L.; Li, X.B.; Sun, H.W.; Branigan, D.; Zeng, Z.; Si, H.F.; Li, J.; Chen, J.; Xiong, Z.G. Suppression of TRPM7 inhibits proliferation, migration, and invasion of malignant human glioma cells. *CNS Neurosci. Ther.*, **2015**, *21*(3), 252-261.
- [46] Greenman, C.; Stephens, P.; Smith, R.; Dalgleish, G.L.; Hunter, C.; Bignell, G.; Davies, H.; Teague, J.; Butler, A.; Stevens, C.; Edkins, S.; O'Meara, S.; Vastrik, I.; Schmidt, E.E.; Avis, T.; Barthorpe, S.; Bhamra, G.; Buck, G.; Choudhury, B.; Clements, J.; Cole, J.; Dicks, E.; Forbes, S.; Gray, K.; Halliday, K.; Harrison, R.; Hills, K.; Hinton, J.; Jenkinson, A.; Jones, D.; Menzies, A.; Mironenko, T.; Perry, J.; Raine, K.; Richardson, D.; Shepherd, R.; Small, A.; Tofts, C.; Varian, J.; Webb, T.; West, S.; Widaa, S.; Yates, A.; Cahill, D.P.; Louis, D.N.; Goldstraw, P.; Nicholson, A.G.; Brasseur, F.; Looijenga, L.; Weber, B.L.; Chiew, Y.E.; DeFazio, A.; Greaves, M.F.; Green, A.R.; Campbell, P.; Birney, E.; Easton, D.F.; Chenevix-Trench, G.; Tan, M.H.; Khoo, S.K.; Teh, B.T.; Yuen, S.T.; Leung, S.Y.; Wooster, R.; Futreal, P.A.; Stratton, M.R. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, **2007**, *446*(7132), 153-158.

- [47] Shen, B.; Sun, L.; Zheng, H.; Yang, D.; Zhang, J.; Zhang, Q. The association between single-nucleotide polymorphisms of TRPM7 gene and breast cancer in Han Population of Northeast China. *Med. Oncol.*, **2014**, *31*(7), 51.
- [48] Dai, Q.; Shrubsole, M.J.; Ness, R.M.; Schlundt, D.; Cai, Q.; Smalley, W.E.; Li, M.; Shyr, Y.; Zheng, W. The relation of magnesium and calcium intakes and a genetic polymorphism in the magnesium transporter to colorectal neoplasia risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2007**, *86*(3), 743-751.
- [49] Park, Y.R.; Chun, J.N.; So, I.; Kim, H.J.; Baek, S.; Jeon, J.H.; Shin, S.Y. Data-driven analysis of TRP channels in cancer: linking variation in gene expression to clinical significance. *Cancer Genomics Proteomics*, **2016**, *13*(1), 83-90.
- [50] Sun, Y.; Selvaraj, S.; Varma, A.; Derry, S.; Sahnoun, A.E.; Singh, B.B. Increase in serum Ca²⁺/Mg²⁺ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*(1), 255-263.
- [51] 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*, **2014**, *1843*(9), 1839-1850.
- [52] Qin, Y.; Liao, Z.W.; Luo, J.Y.; Wu, W.Z.; Lu, A.S.; Su, P.X.; Lai, B.Q.; Wang, X.X. Functional characterization of TRPM7 in nasopharyngeal carcinoma and its knockdown effects on tumorigenesis. *Tumour Biol.*, **2016**, *37*(7), 9273-9283.
- [53] Yee, N.S.; Kazi, A.A.; Li, Q.; Yang, Z.; Berg, A.; Yee, R.K. Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis. *Biol. Open*, **2015**, *4*(4), 507-514.
- [54] Yee, N.S.; Zhou, W.; Liang, I.C. Transient receptor potential ion channel Trpm7 regulates exocrine pancreatic epithelial proliferation by Mg²⁺-sensitive Socs3a signaling in development and cancer. *Dis. Model. Mech.*, **2011**, *4*(2), 240-254.
- [55] Alptekin, M.; Eroglu, S.; Tutar, E.; Sencan, S.; Geyik, M.A.; Ulasli, M.; Demiryurek, A.T.; Camci, C. Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol.*, **2015**, *36*(12), 9209-9213.
- [56] Wang, J.; Xiao, L.; Luo, C.H.; Zhou, H.; Hu, J.; Tang, Y.X.; Fang, K.N.; Zhang, Y. Overexpression of TRPM7 is associated with poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2014**, *15*(9), 3955-3958.
- [57] Chen, J.P.; Wang, J.; Luan, Y.; Wang, C.X.; Li, W.H.; Zhang, J.B.; Sha, D.; Shen, R.; Cui, Y.G.; Zhang, Z.; Zhang, L.M.; Wang, W.B. TRPM7 promotes the metastatic process in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.*, **2015**, *356*(2 Pt B), 483-490.
- [58] 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), 813-822.
- [59] Middelbeek, J.; Kuipers, A.J.; Henneman, L.; Visser, D.; Eidhof, I.; van Horssen, R.; Wieringa, B.; Canisius, S.V.; Zwart, W.; Wessels, L.F.; Sweep, F.C.; Bult, P.; Span, P.N.; van Leeuwen, F.N.; Jalink, K. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res.*, **2012**, *72*(16), 4250-4261.
- [60] 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*(1), 96-102.
- [61] Mandavilli, S.; Singh, B.B.; Sahnoun, A.E. Serum calcium levels, TRPM7, TRPC1, microcalcifications, and breast cancer using breast imaging reporting and data system scores. *Breast Cancer (Dove Med. Press)*, **2012**, *2013*(5), 1-7.
- [62] Chen, W.L.; Barszczyk, A.; Turlova, E.; Deurloo, M.; Liu, B.; Yang, B.B.; Rutka, J.T.; Feng, Z.P.; Sun, H.S. Inhibition of TRPM7 by carvedilol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*, **2015**, *6*(18), 16321-16340.
- [63] Chen, W.L.; Turlova, E.; Sun, C.L.; Kim, J.S.; Huang, S.; Zhong, X.; Guan, Y.Y.; Wang, G.L.; Rutka, J.T.; Feng, Z.P.; Sun, H.S. Xyloketal B suppresses glioblastoma cell proliferation and migration *in vitro* through inhibiting TRPM7-regulated PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Mar. Drugs*, **2015**, *13*(4), 2505-2525.
- [64] 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*(12), 2773-2781.
- [65] Fonfria, E.; Murdock, P.R.; Cusdin, F.S.; Benham, C.D.; Kelsell, R.E.; McNulty, S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **2006**, *26*(3), 159-178.
- [66] Lee, B.C.; Hong, S.E.; Lim, H.H.; Kim, D.H.; Park, C.S. Alteration of the transcriptional profile of human embryonic kidney cells by transient overexpression of mouse TRPM7 channels. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2011**, *27*(3-4), 313-326.
- [67] Visser, D.; Middelbeek, J.; van Leeuwen, F.N.; Jalink, K. Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease. *Eur. J. Cell Biol.*, **2014**, *93*(10-12), 455-465.
- [68] Zhou, W.; Guo, S.; Xiong, Z.; Liu, M. Oncogenic role and therapeutic target of transient receptor potential melastatin 7 channel in malignancy. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2014**, *18*(10), 1177-1196.
- [69] Yee, N.S.; Kazi, A.A.; Yee, R.K. Cellular and developmental biology of TRPM7 channel-kinase: implicated roles in cancer. *Cells*, **2014**, *3*(3), 751-777.
- [70] Park, H.S.; Hong, C.; Kim, B.J.; So, I. The pathophysiologic roles of TRPM7 channel. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **2014**, *18*(1), 15-23.
- [71] Ryazanova, L.V.; Rondon, L.J.; Zierler, S.; Hu, Z.; Galli, J.; Yamaguchi, T.P.; Mazur, A.; Fleig, A.; Ryazanov, A.G. TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. *Nat. Commun.*, **2010**, *1*, 109.
- [72] Abed, E.; Moreau, R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif.*, **2007**, *40*(6), 849-865.
- [73] 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*(14), 2275-2278.
- [74] Inoue, K.; Xiong, Z.G. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells *via* the ERK pathway. *Cardiovasc. Res.*, **2009**, *83*(3), 547-557.
- [75] Sahni, J.; Tamura, R.; Sweet, I.R.; Scharenberg, A.M. TRPM7 regulates quiescent/proliferative metabolic transitions in lymphocytes. *Cell Cycle*, **2010**, *9*(17), 3565-3574.
- [76] Chen, H.C.; Su, L.T.; González-Pagán, O.; Overton, J.D.; Runnels, L.W. A key role for Mg(2+) in TRPM7's control of ROS levels during cell stress. *Biochem. J.*, **2012**, *445*(3), 441-448.
- [77] Liu, H.; Li, J.; Huang, Y.; Huang, C. Inhibition of transient receptor potential melastatin 7 channel increases HSCs

- apoptosis induced by TRAIL. *Life Sci.*, **2012**, *90*(15-16), 612-618.
- [78] 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**, *51*(2), 729-742.
- [79] 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**, *15*(9), 2425-2438.
- [80] Cai, Z.; Jitkaew, S.; Zhao, J.; Chiang, H.C.; Choksi, S.; Liu, J.; Ward, Y.; Wu, L.G.; Liu, Z.G. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.*, **2014**, *16*(1), 55-65.
- [81] Oh, H.G.; Chun, Y.S.; Park, C.S.; Kim, T.W.; Park, M.K.; Chung, S. Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, *463*(1-2), 7-12.
- [82] Jin, J.; Desai, B.N.; Navarro, B.; Donovan, A.; Andrews, N.C.; Clapham, D.E. Deletion of *Trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg²⁺ homeostasis. *Science*, **2008**, *322*(5902), 756-760.
- [83] Jin, J.; Wu, L.J.; Jun, J.; Cheng, X.; Xu, H.; Andrews, N.C.; Clapham, D.E. The channel kinase, TRPM7, is required for early embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*(5), E225-E233.
- [84] Liu, W.; Su, L.T.; Khadka, D.K.; Mezzacappa, C.; Komiya, Y.; Sato, A.; Habas, R.; Runnels, L.W. TRPM7 regulates gastrulation during vertebrate embryogenesis. *Dev. Biol.*, **2011**, *350*(2), 348-357.
- [85] Cheng, H.; Feng, J.M.; Figueiredo, M.L.; Zhang, H.; Nelson, P.L.; Marigo, V.; Beck, A. Transient receptor potential melastatin type 7 channel is critical for the survival of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, **2010**, *19*(9), 1393-1403.
- [86] Cui, L.; Xu, S.M.; Ma, D.D.; Wu, B.L. The effect of TRPM7 suppression on the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Int. Endod. J.*, **2014**, *47*(6), 583-593.
- [87] Xiao, E.; Yang, H.Q.; Gan, Y.H.; Duan, D.H.; He, L.H.; Guo, Y.; Wang, S.Q.; Zhang, Y. Brief reports: TRPM7 Senses mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **2015**, *33*(2), 615-621.
- [88] Liu, Y.S.; Liu, Y.A.; Huang, C.J.; Yen, M.H.; Tseng, C.T.; Chien, S.; Lee, O.K. Mechanosensitive TRPM7 mediates shear stress and modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells through Osterix pathway. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 16522.
- [89] Chen, K.H.; Xu, X.H.; Liu, Y.; Hu, Y.; Jin, M.W.; Li, G.R. TRPM7 channels regulate proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell. Physiol.*, **2014**, *229*(1), 60-67.
- [90] Sah, R.; Mesirca, P.; Mason, X.; Gibson, W.; Bates-Withers, C.; Van den Boogert, M.; Chaudhuri, D.; Pu, W.T.; Mangoni, M.E.; Clapham, D.E. Timing of myocardial *trpm7* deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction, and repolarization. *Circulation*, **2013**, *128*(2), 101-114.
- [91] 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*(18), 2307-2316.
- [92] Su, L.T.; Chen, H.C.; González-Pagán, 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*(4), 858-869.
- [93] Wei, C.; Wang, X.; Chen, M.; Ouyang, K.; Song, L.S.; Cheng, H. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, **2009**, *457*(7231), 901-905.
- [94] Su, L.T.; Liu, W.; Chen, H.C.; González-Pagán, O.; Habas, R.; Runnels, L.W. TRPM7 regulates polarized cell movements. *Biochem. J.*, **2011**, *434*(3), 513-521.
- [95] Stritt, S.; Nurden, P.; Favier, R.; Favier, M.; Ferioli, S.; Gotru, S.K.; van Eeuwijk, J.M.; Schulze, H.; Nurden, A.T.; Lambert, M.P.; Turro, E.; Burger-Stritt, S.; Matsushita, M.; Mittermeier, L.; Ballerini, P.; Zierler, S.; Laffan, M.A.; Chubanov, V.; Gudermann, T.; Nieswandt, B.; Braun, A. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg²⁺ homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 11097.
- [96] Prevarskaya, N. Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks?. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **2014**, *369*(1638), 20130097.
- [97] Stewart, T.A.; Yapa, K.T.; Monteith, G.R. Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1848*(10 Pt B), 2502-2511.
- [98] Li, F.Y.; Chaigne-Delalande, B.; Kanellopoulou, C.; Davis, J.C.; Matthews, H.F.; Douek, D.C.; Cohen, J.I.; Uzel, G.; Su, H.C.; Lenardo, M.J. Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*, **2011**, *475*(7357), 471-476.
- [99] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**, *144*(5), 646-674.
- [100] Trapani, V.; Arduini, D.; Cittadini, A.; Wolf, F.I. From magnesium to magnesium transporters in cancer: TRPM7, a novel signature in tumour development. *Magnes. Res.*, **2013**, *26*(4), 149-155.
- [101] Jiang, J.; Li, M.H.; Inoue, K.; Chu, X.P.; Seeds, J.; Xiong, Z.G. Transient receptor potential melastatin 7-like current in human head and neck carcinoma cells: role in cell proliferation. *Cancer Res.*, **2007**, *67*(22), 10929-10938.
- [102] Dou, Y.; Li, Y.; Chen, J.; Wu, S.; Xiao, X.; Xie, S.; Tang, L.; Yan, M.; Wang, Y.; Lin, J.; Zhu, W.; Yan, G. Inhibition of cancer cell proliferation by midazolam by targeting transient receptor potential melastatin 7. *Oncol. Lett.*, **2013**, *5*(3), 1010-1016.
- [103] Kim, B.J.; Park, E.J.; Lee, J.H.; Jeon, J.H.; Kim, S.J.; So, I. Suppression of transient receptor potential melastatin 7 channel induces cell death in gastric cancer. *Cancer Sci.*, **2008**, *99*(12), 2502-2509.
- [104] Chen, W.L.; Barszczyk, A.; Turlova, E.; Deurloo, M.; Liu, B.; Yang, B.B.; Rutka, J.T.; Feng, Z.P.; Sun, H.S. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*, **2015**, *6*(18), 16321-16340.
- [105] Wang, J.; Liao, Q.J.; Zhang, Y.; Zhou, H.; Luo, C.H.; Tang, J.; Wang, Y.; Tang, Y.; Zhao, M.; Zhao, X.H.; Zhang, Q.Y.; Xiao, L. TRPM7 is required for ovarian cancer cell growth, migration and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, *454*(4), 547-553.
- [106] Zhang, Z.; Faouzi, M.; Huang, J.; Geerts, D.; Yu, H.; Fleig, A.; Penner, R. N-Myc-induced up-regulation of TRPM6/TRPM7 channels promotes neuroblastoma cell proliferation. *Oncotarget*, **2014**, *5*(17), 7625-7634.
- [107] Clark, K.; Middelbeek, J.; Dorovkov, M.V.; Figdor, C.G.; Ryazanov, A.G.; Lasonder, E.; van Leeuwen, F.N. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase,

- phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett.*, **2008**, 582(20), 2993-2997.
- [108] Chen, J.P.; Luan, Y.; You, C.X.; Chen, X.H.; Luo, R.C.; Li, R. TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca(2+) influx. *Cell Calcium*, **2010**, 47(5), 425-432.
- [109] Visser, D.; Langeslag, M.; Kedziora, K.M.; Klarenbeek, J.; Kamermans, A.; Horgen, F.D.; Fleig, A.; van Leeuwen, F.N.; Jalink, K. TRPM7 triggers Ca2+ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium*, **2013**, 54(6), 404-415.
- [110] Middelbeek, J.; Visser, D.; Henneman, L.; Kamermans, A.; Kuipers, A.J.; Hoogerbrugge, P.M.; Jalink, K.; van Leeuwen, F.N. TRPM7 maintains progenitor-like features of neuroblastoma cells: implications for metastasis formation. *Oncotarget*, **2015**, 6(11), 8760-8776.
- [111] Stock, C.; Schwab, A. Ion channels and transporters in metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, 1848(10 Pt B), 2638-2646.
- [112] Gautier, M.; Dhennin-Duthille, I.; Ay, A.S.; Rybarczyk, P.; Korichneva, I.; Ouadid-Ahidouch, H. New insights into pharmacological tools to TR(i)P cancer up. *Br. J. Pharmacol.*, **2014**, 171(10), 2582-2592.
- [113] Chubonov, V.; Schäfer, S.; Ferioli, S.; Gudermann, T. Natural and synthetic modulators of the TRPM7 channel. *Cells*, **2014**, 3(4), 1089-1101.
- [114] Zierler, S.; Yao, G.; Zhang, Z.; Kuo, W.C.; Pörzgen, P.; Penner, R.; Horgen, F.D.; Fleig, A. Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286(45), 39328-39335.
- [115] Chubonov, V.; Mederos y Schnitzler, M.; Meißner, M.; Schäfer, S.; Abstiens, K.; Hofmann, T.; Gudermann, T. Natural and synthetic modulators of SK (K(ca)2) potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, 166(4), 1357-1376.
- [116] 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**, 45(3), 300-309.
- [117] Liang, W.Z.; Chou, C.T.; Lu, T.; Chi, C.C.; Tseng, L.L.; Pan, C.C.; Lin, K.L.; Kuo, C.C.; Jan, C.R. The mechanism of carvacrol-evoked [Ca2+]i rises and non-Ca2+-triggered cell death in OC2 human oral cancer cells. *Toxicology*, **2013**, 303, 152-161.
- [118] Li, W.T.; Zhang, S.Y.; Zhou, Y.F.; Zhang, B.F.; Liang, Z.Q.; Liu, Y.H.; Wei, Y.; Li, C.K.; Meng, X.J.; Xia, M.; Dan, Y.; Song, J.N. Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca(2+) entry-independent regulation of intracellular Ca(2+) homeostasis. *Neurochem. Int.*, **2015**, 90, 107-113.
- [119] Aarts, M.; Iihara, K.; Wei, W.L.; Xiong, Z.G.; Arundine, M.; Cerwinski, W.; MacDonald, J.F.; Tymianski, M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell*, **2003**, 115(7), 863-877.
- [120] Runnels, L.W.; Yue, L.; Clapham, D.E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat. Cell Biol.*, **2002**, 4(5), 329-336.
- [121] Kim, B.J. Involvement of melastatin type transient receptor potential 7 channels in ginsenoside Rd-induced apoptosis in gastric and breast cancer cells. *J. Ginseng Res.*, **2013**, 37(2), 201-209.
- [122] Kim, B.J.; Nam, J.H.; Kwon, Y.K.; So, I.; Kim, S.J. The role of waixenicin A as transient receptor potential melastatin 7 blocker. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2013**, 112(2), 83-89.
- [123] Hofmann, T.; Schäfer, S.; Linseisen, M.; Sytik, L.; Gudermann, T.; Chubonov, V. Activation of TRPM7 channels by small molecules under physiological conditions. *Pflugers Arch.*, **2014**, 466(12), 2177-2189.
- [124] Schafer, S. Mibefradil represents a new class of benzimidazole TRPM7 channel agonists. *Pflugers Arch.*, **2016**, 468(4), 623-634.
- [125] Huguët, F. Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing DeltaF508-CFTR and G551D-CFTR. Cellular and molecular life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2016**, 73(17), 3351-3373.
- [126] Ryazanova, L.V.; Hu, Z.; Suzuki, S.; Chubonov, V.; Fleig, A.; Ryazanov, A.G. Elucidating the role of the TRPM7 alpha-kinase: TRPM7 kinase inactivation leads to magnesium deprivation resistance phenotype in mice. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 7599.
- [127] Kaitsuka, T.; Katagiri, C.; Beesetty, P.; Nakamura, K.; Hourani, S.; Tomizawa, K.; Kozak, J.A.; Matsushita, M. Inactivation of TRPM7 kinase activity does not impair its channel function in mice. *Sci. Rep.*, **2014**, 4, 5718.
- [128] Cordeiro, B.; Shinn, C.; Sellke, F.W.; Clements, R.T. Rotlerin-induced BKCa channel activation impairs specific contractile responses and promotes vasodilation. *Ann. Thorac. Surg.*, **2015**, 99(2), 626-634.

DISCUSSION GENERALE

1. BILAN

Au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré que TRPM7 régule l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. L'invasion cellulaire est une étape importante de la formation des métastases chez les patients atteints d'ACP. La fonction canalaire de TRPM7 et plus particulièrement la régulation de l'influx magnésique et sa kinase sont impliqués.

Dans les cellules non-cancéreuses, TRPM7 régule l'acquisition d'un phénotype invasif secondaire à une exposition au Cd^{2+} *via* sa surexpression et l'augmentation de la concentration de Mg^{2+} dans la cellule.

Enfin, dans les biopsies de patients atteints d'ACP, nous démontrons que TRPM7 est un bon marqueur de l'agressivité du cancer car son expression dans la tumeur primaire est corrélée à celle dans les métastases des ganglions lymphatiques.

2. IMPLICATION DU CANAL TRPM7 DANS L'INVASION BASALE DANS L'ACP

Nous avons démontré que TRPM7 régule l'invasion basale par deux techniques différentes dans les cellules d'ACP : en inhibant son expression à la membrane (Rybarczyk et al., 2017) et en le surexprimant. Ces travaux sont en adéquation avec ceux de Yee en 2015 sur l'implication de TRPM7 dans l'invasion stimulée des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques BxPC-3 et MIA PaCa-2. Plusieurs études décrivent le rôle de TRPM7 comme un acteur de l'invasion cellulaire dans les cancers (**Tableau 8**). Au laboratoire, les expériences démontrant l'implication de TRPM7 dans l'invasion ont été réalisées sur deux lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques exprimant l'oncogène Kras muté. Il serait intéressant d'explorer si un lien fonctionnel existerait entre cet oncogène et TRPM7. Par exemple, Kras muté intervient dans la voie des MAP kinases et Akt, et TRPM7 est impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses *via* ces deux voies (Zhao et al., 2018). Il n'existe pas de données sur des mécanismes communs régulés par TRPM7 et Kras impliqués dans l'invasion cellulaire.

Dans les cellules non-cancéreuses pancréatiques hTERT-HPNE, l'inhibition de TRPM7 n'entraîne aucun effet sur l'invasion. Dans la littérature, d'autres études portent sur le rôle des canaux en comparant des modèles sains et pathologiques. Une étude montre l'implication des canaux SOC dans l'invasion du glioblastome mais pas dans les astrocytes

normaux (Motiani et al., 2013). Le CO-OCS (α -glucosidase inhibitor 1-C-octyl-2-oxa-3-oxocastanospermine) exerce une activité anti-migratoire en ciblant les canaux SOC et les adhésions focales dans les cellules cancéreuses mammaires avec un effet très faible sur les cellules MCF 10A non-cancéreuses (Gueder et al., 2017). Cette absence d'implication de TRPM7 dans l'invasion basale des cellules non-cancéreuses montre un rôle spécifique de TRPM7 dans un modèle pathologique. L'intérêt des canaux ioniques comme cible thérapeutique dans l'ACP est montré dans une étude clinique de 2017 qui utilise SOR-C13, un inhibiteur du canal TRPV6 (Fu et al., 2017).

Néanmoins, concernant le canal TRPM7, celui-ci est exprimé de manière ubiquitaire et va jouer un rôle dans la physiologie de plusieurs organes tels que le cerveau, l'hypophyse, le cœur, les os et le tissu adipeux (Fonfria et al., 2006). Le cibler dans une stratégie thérapeutique pourrait entraîner de nombreux effets secondaires potentiels. TRPM7 a la particularité, par rapport aux autres canaux, d'être fusionné à une α -kinase dont l'activité n'influence pas la fonction canal (Matsushita et al., 2005, Schmitz et al., 2003). Les résultats préliminaires ont montré que la rottlérine (0,35 μ M), un inhibiteur de la famille des α -kinases, diminue l'invasion des cellules MIA PaCa-2. Nous avons ensuite utilisé des modèles de surexpression de TRPM7 sauvage ou délété du domaine kinase afin d'explorer plus précisément le rôle de ce domaine dans l'invasion cellulaire. Pour la première fois, nous montrons le rôle de la kinase de TRPM7 dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. La description des rôles et des substrats de la kinase dans des modèles pathologiques est limitée. Elle régule l'invasion des cellules de neuroblastome *via* la phosphorylation de la myosine IIA (Clark et al., 2008, Visser et al., 2013). Dans le cancer du sein métastatique, l'invasion *in vitro* est inhibée par le TG100-115, un nouvel inhibiteur de la kinase couplée à TRPM7 (Song et al., 2017).

Dans notre étude, lorsque l'on éteint l'expression de TRPM7, la sécrétion des protéases uPA et MMP-2 diminue. Il s'agit de la première étude, dans l'ACP, établissant un lien entre un canal ionique et des protéases dont le rôle est bien décrit dans l'invasion cellulaire. L'interaction fonctionnelle entre les MMPs et les canaux ioniques sont décrits dans plusieurs cancers. Dans le glioblastome, l'utilisation de modulateurs pharmacologiques de TRPM7

(carvacol et nalttriben) montre une variation de l'activité de la MMP-2 (Chen et al., 2015, Wong et al., 2017).

Nos résultats originaux montrent que la régulation de l'invasion par TRPM7 implique également la modulation de la sécrétion d'Hsp90 α , une chaperonne stimulatrice de l'invasion cellulaire. Cette chaperonne participe à l'invasion cellulaire notamment en stabilisant les protéases uPA et MMP-2 au niveau extracellulaire où elles pourront dégrader la matrice (Donet et al., 2014). La MMP-2 est capable de dégrader directement la matrice. L'uPA convertit le plasminogène inactif en plasmine par clivage protéolytique. La plasmine, à son tour, va permettre l'activation protéolytique extracellulaire des MMPs et la dégradation de la matrice extracellulaire prérequis pour l'invasion cellulaire. Nous avons donc vérifié dans notre modèle cellulaire d'ACP qu'Hsp90 α est impliquée dans l'invasion. L'utilisation de STA-12-8666, une combinaison d'agents pharmacologiques contenant un inhibiteur d'Hsp90, améliore la survie des souris transgéniques atteintes d'ACP et diminue la croissance de tumeurs de patients xéno greffées à des souris immunodéficientes (Bobrov et al., 2017).

A contrario, dans les cellules non-cancéreuses pancréatiques, la diminution d'expression d'Hsp90 α va augmenter légèrement l'invasion, ce qui montre un rôle différent de cette chaperonne dans les cellules non-cancéreuses. Cette chaperonne possède un spectre d'interaction très large (environ 10 % du protéome) dont une faible proportion est connue (Echeverria et al., 2011). L'augmentation d'invasion suite à l'extinction d'Hsp90 α pourrait s'expliquer par un rôle protecteur de cette chaperonne contre l'invasion cellulaire dans les cellules non-cancéreuses. En effet, les différences d'expression et de localisation entre modèles physiologiques et pathologiques permettraient des interactions différentes et possiblement la stabilisation de protéines anti-oncogéniques. La diminution d'expression d'Hsp90 α pourrait entraîner la dégradation de protéines clientes anti-oncogéniques (Barrott et al., 2013). Dans des lymphocytes normaux, Hsp90 est capable de stimuler l'activité de la caséine kinase II. Il serait possible que l'extinction de son expression perturbe également des voies de signalisations dépendantes d'activité kinase qui entraîneraient l'augmentation de l'invasion observée (Miyata et al., 1992).

Nous démontrons dans le modèle d'ACP que TRPM7 et Hsp90 α sont impliqués dans la régulation de l'invasion cellulaire. Nous observons également que ces deux protéines sont

surexprimées dans le modèle cellulaire métastatique MIA PaCa-2 comparée aux cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés sur les tissus d'ACP pour TRPM7 qui va augmenter en corrélation avec le grade (Rybarczyk et al., 2012). Il est démontré qu'Hsp90 α est surexprimé dans le cancer (Prodromou, 2016). De plus, nous démontrons qu'il n'y a pas de régulation transcriptionnelle entre ces deux gènes. La régulation de la sécrétion d'Hsp90 α par TRPM7 ne passe pas par des modifications de ses transcrits. Le mécanisme de sécrétion d'Hsp90 α n'est pas totalement élucidé. Dans la littérature, il est proposé qu'Hsp90 α soit secrétée grâce à des microvésicules (McCready et al., 2010). Cette hypothèse pourrait être valable dans notre étude car lorsque l'on inhibe TRPM7, on ne modifie pas l'expression des ARN messagers ni les niveaux protéiques d'Hsp90 α mais la quantité de protéine détectées dans le milieu extracellulaire diminue. Nous pourrions évaluer si TRPM7 et Hsp90 α sont colocalisées dans les microvésicules. Dans un modèle de glioblastome, TRPM7, *via* la génération de pics calciques, régule la sécrétion de vésicules extracellulaires permettant la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales du microenvironnement (Thuringer et al., 2018). Les cellules cancéreuses pancréatiques sont capables de sécréter des microvésicules qui vont stimuler le potentiel migratoire des cellules souches cancéreuses. La co-injection des cellules cancéreuses d'adénocarcinome pancréatique et des cellules souches cancéreuses diminue la survie de souris comparée à l'injection de cellules souches cancéreuses seules, ce qui démontre l'importance d'une communication entre les différentes cellules cancéreuses dans la progression de l'ACP *in vivo* (Kuc et al., 2018).

Les résultats montrent que TRPM7 et Hsp90 α régulent l'invasion ; nous avons voulu savoir s'ils le faisaient par une voie commune. Nous avons donc effectué des extinctions combinées de TRPM7 et Hsp90 α . L'absence d'effet additif montre que ces deux acteurs régulent l'invasion *via* une même voie. Nous avons ensuite effectué des doubles transfections de siRNA contre Hsp90 α et des formes sauvage ou délété de la kinase de TRPM7 pour préciser l'implication commune du domaine kinase et de la chaperonne. Ces expériences ne peuvent pas être utilisées car la double transfection perturbe la viabilité cellulaire. Nous prouvons pour la première fois l'interaction fonctionnelle entre un canal ionique et l'isoforme α de la protéine chaperonne Hsp90 dans l'invasion cellulaire dans l'ACP. Des études ont déjà montré des interactions fonctionnelles entre les canaux et Hsp90 dans d'autres modèles. Par

exemple, Hsp90 interagit avec le canal chlorure CIC-2 et module son activité dans les cellules HEK-293 (Hinzpeter et al., 2006). Dans les cellules β pancréatiques, Hsp90 interagit avec le canal potassique sensible à l'ATP et la surexpression de la chaperonne permet l'expression à la membrane d'un canal sous une forme mutée. Ce canal muté conduit à des anomalies de sécrétion de l'insuline dépendante du potentiel de membrane (Yan et al., 2010). La forme α uniquement est capable d'interagir avec le canal potassique hERG et modifier son taux de glycosylation influençant sa maturation dans des cellules HEK-293 surexprimant ce canal (Peterson et al., 2012).

De plus, nos résultats combinant plusieurs techniques montrent une interaction physique directe entre TRPM7 et Hsp90 α dans les cellules d'ACP. Les expériences en immunofluorescence montrent une potentielle co-localisation de TRPM7 et Hsp90 α . Ce marquage est localisé différemment selon le modèle cellulaire (cancéreux ou non). Les interprétations sur la localisation doivent être prudentes car un pixel peut contenir de nombreuses protéines. De plus, la localisation cellulaire précise des marquages doit être explorée par un passage des échantillons en microscopie confocale permettant de réaliser des images en coupes plus précises des cellules. La microscopie confocale démontre un rapprochement des protéines laissant l'hypothèse d'une interaction possible. Cette technique ne permet pas de démontrer une interaction physique car un pixel peut contenir de nombreuses protéines.

Pour démontrer une interaction, il y a nécessité d'utiliser des techniques plus sensibles. Nous avons donc utilisé la technique d'immunoprécipitation pour démontrer une interaction physique grâce à des anticorps primaires immunoprécipitants qui vont capter la protéine d'intérêt liée à ces partenaires. TRPM7 et Hsp90 α font partie d'un même complexe protéique seulement dans les cellules cancéreuses MIA PaCa-2. Dans les cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE, on détecte une très faible bande d'intensité similaire au contrôle négatif seulement lorsque l'on immunoprécipite TRPM7 et que l'on révèle Hsp90 total. Néanmoins, cette technique ne permet pas de démontrer une interaction directe entre les deux protéines car il peut y avoir des protéines intermédiaires entre TRPM7 et Hsp90 α .

Pour démontrer une interaction physique directe entre deux protéines, la technique de Proximity Ligation Assay (PLA) est utilisée. Cette technique permet de détecter des interactions à une distance n'excédant pas 40 nm, une résolution qui est plus élevée

comparée à l'immunofluorescence couplée à la microscopie confocale. Les résultats montrent, dans les cellules MIA PaCa-2, des points preuves d'une interaction directe. Le nombre de points dans les cellules cancéreuses pancréatiques est supérieur aux cellules non-cancéreuses hTERT-HPNE, ce qui démontre une interaction spécifique dans un modèle pathologique. Néanmoins, on détecte aussi des points d'interaction dans les cellules hTERT-HPNE alors qu'il y a une absence d'interaction dans les expériences d'immunoprécipitations. Ces divergences peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs : l'immunofluorescence couplée à la PLA est une technique de détection plus sensible que l'émission de luminescence utilisée pour détecter les protéines en Western Blot. De plus, la PLA s'effectue sur cellules fixées, ce qui permet de mieux conserver toutes les interactions qu'elles soient de fortes ou de faibles affinités. Les échantillons de PLA doivent être également analysés par microscopie confocale pour préciser la localisation du complexe TRPM7-Hsp90 α .

De plus, les résultats préliminaires sur les modèles surexprimant TRPM7 sauvage ou sans le domaine kinase montrent que ce domaine serait impliqué dans la localisation cellulaire du complexe. La kinase pourrait jouer un rôle de « séquence signal » d'adressage à la membrane du complexe. Ensuite, nous avons voulu savoir si la kinase était impliquée également dans l'interaction directe entre TRPM7 et Hsp90 α . Nous avons effectué des immunoprécipitations contre l'étiquette HA de TRPM7 avec les cellules surexprimant TRPM7 sauvage ou délété du domaine kinase et nous avons révélé avec un anticorps dirigé contre Hsp90 α . Nous n'avons pas détecté de signal en Western Blot. En immunoprécipitant avec Hsp90 α et en révélant avec l'anticorps contre l'étiquette HA, nous n'avons pas non plus obtenu de signal en Western Blot. Afin de solutionner ces problèmes techniques, nous pourrions réaliser les immunoprécipitations non par sur les modèles de surexpression mais sur les clones sauvages ou sans le domaine kinase mis au point grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Des interactions fonctionnelles entre Hsp90 et des enzymes sont décrites dans plusieurs études. Par exemple, l'interaction entre Hsp90 α et l'enzyme Hcdt1 régule négativement sa sécrétion et entraîne un défaut de formation du tube neural à cause d'un remodelage de la matrice et une migration des cellules anormales *in vivo* (Sarkar et al., 2012). Dans des cellules de lymphomes, Hsp90 est co-immunoprécipitée avec la caséine kinase II et la présence de la chaperonne stimule l'activité sérine/thréonine kinase (Miyata et al., 1992). Il serait intéressant de savoir, lorsque que l'on éteint l'expression d'Hsp90 α , si

l'activité kinase de TRPM7 est modifiée en regardant la phosphorylation de ses substrats connus. Une expérience préliminaire montre que, lorsque les cellules MIA PaCa-2 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre Hsp90 α , la phosphorylation de la myosine IIA a tendance à diminuer. Néanmoins, cette expérience doit être confirmée sur d'autres passages. Dans notre contexte portant sur l'invasion cellulaire, il serait judicieux d'observer la phosphorylation d'une protéine impliquée dans l'invasion cellulaire dans les cellules d'ACP, comme par exemple l'autophosphorylation du canal TRPM7.

L'interaction fonctionnelle entre TRPM7 pourrait être bidirectionnelle : Hsp90 α , *via* son interaction avec TRPM7, pourrait agir sur la kinase et TRPM7 pourrait également agir sur Hsp90 α régulant sa sécrétion. En effet, TRPM7 pourrait avoir un rôle *via* son activité enzymatique lui permettant de phosphoryler des substrats. Hsp90 α est une chaperonne qui possède de nombreux résidus phosphorylables notamment des sérines et des thréonines. Parfois, les résidus sont connus mais les enzymes responsables de ces modifications post-traductionnelles n'ont pas été découvertes (Mollapour et al., 2010). Lorsque l'expression de TRPM7 est inhibée par un siRNA, la phosphorylation des sérines d'Hsp90 α diminue. Néanmoins, lorsque l'on surexprime TRPM7 sauvage ou délété du domaine kinase, il n'y a pas de modification de la phosphorylation d'Hsp90 α . Ces résultats divergents sur l'implication de la kinase de TRPM7 dans la phosphorylation d'Hsp90 α peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses. Il est possible que toutes les sérines d'Hsp90 α soient déjà phosphorylées dans notre modèle d'ACP et donc la surexpression de TRPM7 n'est pas capable de modifier le taux de phosphorylation de la protéine. L'absence de diminution lorsque l'on supprime le domaine kinase peut s'expliquer par un phénomène de compensation par d'autres kinases. En effet, Hsp90 peut être phosphorylée sur ses résidus sérine dans les cellules cancéreuses (Lees-Miller et al., 1989, Old et al., 2009). Nos expériences nous permettent de conclure que TRPM7 est impliqué dans la modification post-traductionnelle d'Hsp90 α mais ne permette pas de préciser si la kinase est impliquée. Pour pouvoir savoir si la kinase de TRPM7 est impliquée de manière directe ou non dans la phosphorylation d'Hsp90 α , nous pourrions utiliser un inhibiteur des α -kinases, la rottlérine, ou un nouvel inhibiteur plus spécifique, le TG100-115. Des tests de phosphorylations *in vitro* sur Hsp90 α purifiées pourraient également être effectués. Enfin, une fois que le modèle de

cellules mutées pour le domaine kinase de TRPM7 par la technologie CRISPR-Cas9 sera mis au point, il serait intéressant d'évaluer la phosphorylation des sérines dans ce modèle.

L'implication de la fonction ionique de TRPM7 est également envisageable dans la régulation de l'invasion Hsp90 α . Les résultats du laboratoire ont déjà montré un rôle de TRPM7 dans la migration cellulaire dépendante du Mg²⁺ (Rybarczyk et al., 2012). TRPM7 constitue la voie d'entrée principale du Mg²⁺ dans les cellules d'ACP. L'invasion des cellules d'ACP régulée par TRPM7 est Mg²⁺-dépendante (Rybarczyk et al., 2017). Nous arrivons également à cette conclusion lorsque l'on surexprime TRPM7 en absence de Mg²⁺, où l'invasion est fortement diminuée. Cependant, il y a un effet additif, en absence Mg²⁺ extracellulaire, lorsque l'on surexprime TRPM7 comparé à l'effet dans les cellules exprimant un vecteur vide, ce qui montre que cet ion régule l'invasion par d'autres voies que *via* TRPM7. L'absence d'effet additif sur l'invasion entre les variations du Mg²⁺ extracellulaire et l'extinction d'Hsp90 α révèle qu'ils régulent l'invasion par une voie commune. Le rôle de la perturbation de l'homéostasie magnésique est connu dans l'invasion cellulaire. Une perturbation, en faveur d'une concentration en Mg²⁺ extracellulaire plus faible (suite à un régime alimentaire des souris appauvri en Mg²⁺), entraîne un développement de la tumeur primaire plus faible en parallèle d'un développement des métastases plus important *in vivo* (Nasulewicz et al., 2004). Les cellules cancéreuses de côlon présentent un taux cytoplasmique de Mg²⁺ faible (0,3 mM) (Castiglioni et al., 2015). Dans les cellules cancéreuses de glioblastome, la concentration en Mg²⁺ liée est plus importante que celle du Mg²⁺ libre (Chandra et al., 2016). Cet ion est un cofacteur enzymatique important et est impliqué dans de nombreux processus cancéreux. Néanmoins, les mécanismes et les acteurs régulant son homéostasie sont loin d'être aussi bien connus que pour le Ca²⁺. Il a été démontré que l'élévation du Mg²⁺ cytosolique stimule la fonction kinase (Ryazanova, et al. 2004). L'analyse des phosphorylations d'Hsp90 α , en faisant varier le Mg²⁺ extracellulaire (soit en le retirant ou en augmentant la concentration extracellulaire à 10 mM) donneraient une indication sur son rôle dans la régulation de la kinase dans notre modèle, à condition que la kinase soit impliquée directement dans la phosphorylation d'Hsp90 α .

De plus, Hsp90 ne possède pas les séquences qui lui permettent d'être secrétées par les voies classiques. Les mécanismes de régulation de Hsp90 α ne sont pas connus dans les

cellules cancéreuses d'ACP. Les cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sont capables également de modifier la structure tertiaire d'Hsp90 d'une association en dimère majoritaire vers une association en oligomères en se fixant sur l'extrémité carboxylique (Garnier et al., 2002). Plus précisément, le Mg^{2+} stimule la formation de tétramères, d'hexamères ou de décimères. La formation de ces structures permettraient à Hsp90 α d'augmenter sa capacité d'interaction avec ses co-chaperonnes ou des protéines cibles et potentiellement avec TRPM7 (Moulintraffort et al., 2010). Pour répondre à cette question, il est nécessaire de réaliser les expériences d'immunofluorescence, d'immunoprécipitation et de PLA en comparant les conditions en présence et en absence de Mg^{2+} extracellulaire sur les cellules cancéreuses afin de savoir si cet ion affecte l'interaction entre TRPM7 et Hsp90 α et la localisation du complexe. De plus, nous pourrions utiliser des cellules non-cancéreuses en présence d'une forte concentration de Mg^{2+} extracellulaire (10 mM) et étudier les réponses cellulaires au niveau de l'expression de TRPM7 et Hsp90 α , de leur interaction et la localisation du complexe ainsi que sur l'invasion.

Les modèles utilisés pour obtenir ces résultats sur l'implication du domaine kinase surexpriment TRPM7 et la transfection des plasmides entraîne de la mortalité cellulaire. Il serait judicieux d'utiliser un système pour évaluer le rôle de la kinase endogène des cellules. Pour atteindre cet objectif, nous pourrions utiliser des inhibiteurs spécifiques. Néanmoins, à ce jour, il n'existe que des inhibiteurs de la famille des α -kinases et un inhibiteur récent plus spécifique, le TG100-115. Nous avons donc choisi d'utiliser le système des ciseaux moléculaires CRISPR-cas9 pour déléter le domaine kinase endogène de TRPM7. Les clones, sélectionnés par la puromycine, présentent une extinction partielle des transcrits et de la protéine complète de TRPM7. La difficulté d'obtenir une extinction complète peut s'expliquer par le fait que les cellules cancéreuses sont polyploïdes et qu'il est difficile en une seule transfection de muter tous les allèles. La diminution des transcrits complet importante par rapport à la diminution de la protéine sauvage plus faible pourrait s'expliquer par un turnover de TRPM7 lent dans les cellules cancéreuses. La prochaine étape est de transfecter une deuxième fois les clones qui présentent déjà une diminution de l'expression de la protéine complète pour essayer de muter tous les allèles. Les cellules étant déjà résistantes à l'antibiotique, nous ne pourrions pas les sélectionner à nouveau par cette méthode. Les cellules transfectées pourront être triées par cytométrie en flux grâce à la détection de la

fluorescence verte due à l'expression de la GFP (contenue dans le plasmide d'expression de la nucléase Cas9). La prochaine étape de la stratégie est d'induire l'expression de TRPM7 complet contenant une mutation invalidante du domaine kinase (K1648R) au lieu de le déléter. Les résultats entre le modèle sans la kinase et avec la mutation ponctuelle pourraient être différents car enlever le domaine kinase peut jouer sur la conformation de la protéine et son adressage à la membrane. Nos résultats préliminaires en immunofluorescence montrent que lorsque l'on surexprime TRPM7 sans la kinase comparé à TRPM7 complet, la localisation de TRPM7 est différente. Nous avons également comme projet d'utiliser cette stratégie pour déléter le pore de sélectivité de TRPM7 afin de déterminer le rôle de l'activité canalaire seule.

Pour appuyer nos découvertes sur les modèles cellulaires, il est important également d'étudier nos protéines d'intérêts sur des tissus de patients. Il est démontré dans la littérature que TRPM7 est surexprimé dans plusieurs cancers en lien avec les paramètres cliniques, ce qui pourrait faire de ce canal un bon marqueur pronostic (Gautier, et al. 2016). Nous établissons un lien entre l'expression de TRPM7 dans la tumeur primaire et dans les métastases, ce qui suggère que TRPM7 est un marqueur pronostic de l'agressivité tumoral et un rôle fonctionnel dans la capacité métastatique *in vivo*. Il serait intéressant de regarder l'expression de TRPM7 et Hsp90 α dans les tumeurs, les métastases et les tissus sains. Nos expériences préliminaires en immunohistochimie en double marquage sur des coupes de tissus ne nous ont pas permis de conclure. Nous devons refaire les expériences en effectuant les marquages séparément sur des coupes sériées ou mettre au point un double marquage immunofluorescent sur le même échantillon de tissus.

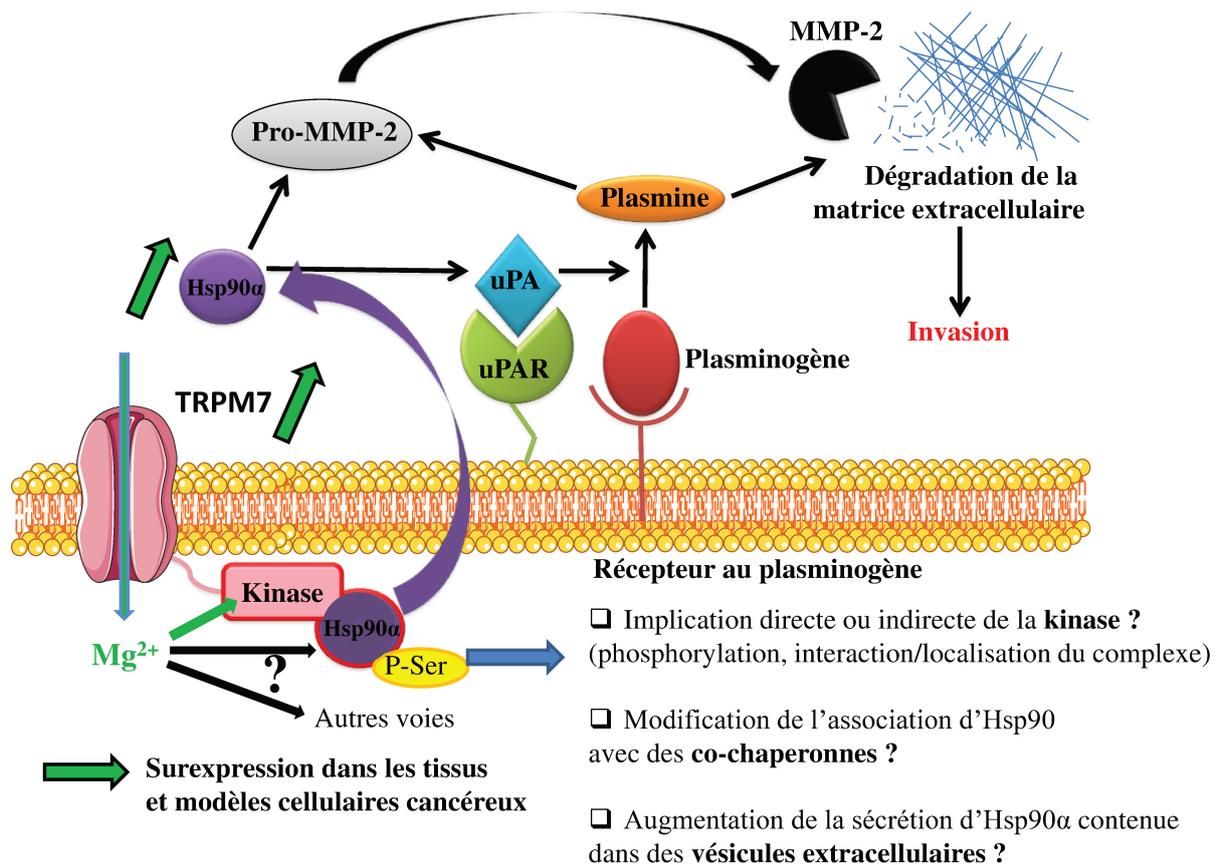


Figure 52 : Conclusion sur les mécanismes impliquant TRPM7 dans l'invasion cellulaire basale des cellules d'ACP.

3. ROLE DU CANAL TRPM7 DANS LA TRANSFORMATION VERS UN PHENOTYPE INVASIF DES CELLULES NON-CANCEREUSES

Nous avons étudié le rôle de TRPM7 et avons décrit un mécanisme dans un modèle cellulaire invasif d'ACP. Il est intéressant de savoir si notre canal possède un rôle dans un autre modèle de cellules épithéliales non-cancéreuses transformées par un agent cancérigène. Les modèles de surexpression montrent que TRPM7, et plus particulièrement son domaine kinase, est impliqué dans l'acquisition par les cellules non-cancéreuses pancréatiques hTERT-HPNE d'un phénotype invasif. Nous avons utilisé un modèle d'exposition chronique au Cd^{2+} qui a été validé pour induire une transformation cancéreuse des cellules épithéliales non-cancéreuses mammaires, pancréatiques et pulmonaires (Benbrahim-Tallaa et al., 2009, Person et al., 2013, Qu et al., 2012). Les données épidémiologiques établissent un lien entre l'exposition au Cd^{2+} et le développement de cancers du pancréas et du sein (Garcia-Esquinas

et al., 2014, Li et al., 2011, Strumylaite et al., 2014, Van Maele-Fabry et al., 2016). Le Cd^{2+} stimule l'hypertrophie et l'hyperplasie des épithéliums mammaires et utérins en mimant l'effet des œstrogènes, le classant dans la catégorie des métallo-œstrogènes (Johnson et al., 2003). Cependant, son rôle dans la transformation cancéreuse des cellules épithéliales semble indépendante d'une activation des récepteurs aux œstrogènes (Benbrahim-Tallaa et al., 2009, Person et al., 2013, Qu et al., 2012).

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que l'exposition au Cd^{2+} augmente l'expression de TRPM7 et les courants cationiques membranaires. Dans un modèle *in vivo*, les cellules musculaires lisses pulmonaires exposées à la fumée de cigarette contenant du Cd^{2+} présentent également une augmentation de l'expression de TRPM7 (Lin et al., 2016). Cependant, la fumée de cigarette est un cocktail de plusieurs agents cancérogènes et cette étude ne permet d'affirmer que la surexpression de TRPM7 soit induite par le Cd^{2+} . TRPM7 permet l'entrée de Ca^{2+} , de Mg^{2+} mais également du Cd^{2+} (Monteilh-Zoller et al., 2003). D'autres canaux sont perméables au Cd^{2+} , notamment TRPV6, qui est impliqué dans l'invasion cellulaire dans le cancer du sein mais le lien entre le Cd^{2+} , TRPV6 et le développement du cancer n'a pas été clairement établi (Jiang et al., 2016, Kovacs et al., 2013).

Suite à l'étude de l'expression et des propriétés électrophysiologiques de TRPM7, nous avons ensuite étudié l'effet du Cd^{2+} sur l'entrée cationique et les concentrations cytoplasmiques en Ca^{2+} et en Mg^{2+} . Dans les cellules MCF10A non-traitées, de manière surprenante, la diminution d'expression de TRPM7 va augmenter la concentration calcique cytosolique. L'extinction de TRPM7 diminue la concentration cytosolique de Mg^{2+} , qui est un antagoniste du Ca^{2+} (Altura et al., 1981). Ainsi l'augmentation de l'homéostasie du Ca^{2+} pourrait être la conséquence de la diminution de l'absorption cellulaire du Mg^{2+} par TRPM7. Dans un autre modèle de cellules cancéreuses prostatiques, le canal TRPM7 permet l'entrée de Ca^{2+} en présence d'un ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ augmenté, ce qui démontre l'impact de l'équilibre entre l'homéostasie de ces deux ions dans la progression tumorale (Sun et al., 2013). L'extinction de TRPM7 pourrait également entraîner une entrée compensatoire de Ca^{2+} par d'autres canaux comme les Orai ou de la famille des TRP. Des résultats préliminaires au laboratoire montrent que l'extinction de TRPM7 augmente l'entrée SOC dans les cellules

stellaires pancréatiques. D'après nos résultats, l'inhibition de TRPM7 ne semble pas modifier la concentration cytosolique de Mg^{2+} des MCF-10A non traitées.

Dans les cellules épithéliales pancréatiques hTERT-HPNE non traitées, l'expression d'autres canaux perméables au Mg^{2+} pourrait expliquer l'augmentation de la concentration magnésique cytoplasmique consécutive à l'extinction de TRPM7. Il est décrit que l'expression des transporteurs magnésiques SLC41A1, SLC41A2 et MagT1 compense la diminution de prolifération cellulaire suite à l'extinction de TRPM7 (Deason-Towne et al., 2011, Mandt et al., 2011, Sahni et al., 2007).

Dans les cellules traitées, une augmentation des concentrations cytoplasmiques calcique et magnésique est observée. L'extinction de TRPM7 dans ces cellules va diminuer le Mg^{2+} cytoplasmique. Le Mg^{2+} est décrit comme régulateur important dans notre autre modèle d'ACP invasif. La relation entre le Mg^{2+} et le cancer est complexe. En effet, l'accumulation du Mg^{2+} augmente la capacité proliférative des cellules cancéreuses alors que des études épidémiologiques et *in vivo* montrent que la déficience en Mg^{2+} est un facteur de risque du cancer et de la formation des métastases (Larsson et al., 2005, Nasulewicz et al., 2004, Wolf et al., 2004). L'homéostasie du Ca^{2+} est également impactée par l'exposition au Cd^{2+} mais de manière moins marquée que pour le Mg^{2+} .

Le traitement au Cd^{2+} induit la modification de la morphologie des cellules MCF 10A. Ces modifications sont caractérisées par une augmentation de l'indice de circularité et par des cellules que ne poussent plus en « clusters » mais de façon individualisée dans nos conditions de culture. Ces modifications ajoutées à l'augmentation des propriétés de migration et d'invasion répondent à la définition de la transition migratoire collective vers amiboïde (CAT: collective-to-amoeboïd transition) (Lehmann et al., 2017). Cette modification phénotypique est accompagnée d'une diminution d'un marqueur épithélial, l'E-cadhérine et d'une augmentation des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine). Il est démontré que les cellules invasives possèdent une grande plasticité afin de s'adapter aux conditions du microenvironnement. L'AMT (amoeboid to mesenchymal transition) permet le passage des cellules effectuant une migration amiboïde indépendante des protéases vers des cellules mésenchymateuses qui vont envahir leur environnement *via* l'expression de protéases (Krakhmal et al., 2015). Nos résultats montrent que TRPM7 est impliqué dans ces phénomènes de modification de la morphologie et de transition

phénotypique. Dans un autre modèle de cellules cancéreuses prostatique, le TGF β induit la TEM *via* TRPM7 (Sun et al., 2018). Dans les cellules, hTERT-HPNE, nous n'observons pas de variations de la morphologie et les résultats préliminaires ne montrent pas de modifications des marqueurs mésenchymateux suite au traitement. Il serait possible que la dose utilisée sur ces cellules ne soit pas assez élevée pour induire un effet. Nous avons donc utilisé la dose du protocole de traitement des MCF10A (2,5 μ M) sur les hTERT-HPNE. L'utilisation de cette dose est létale pour les cellules.

L'exposition au Cd²⁺ augmente l'invasion cellulaire dans les deux lignées. C'est la première étude qui démontre le rôle de TRPM7 dans l'acquisition du phénotype invasif stimulée par un polluant carcinogène. Dans les deux modèles, le Cd²⁺ augmente la sécrétion des MMPs mais celle-ci n'est pas régulée par TRPM7, démontrant que TRPM7 régule l'invasion cellulaire par un autre mécanisme, par exemple, en modifiant l'expression d'autres protéases ou leurs inhibiteurs. Une étude *in vivo* chez des rats montre que l'injection intrapéritonéale de Cd²⁺ (1 mg/kg) après 96 heures entraîne une augmentation de la cathépsine L et une diminution d'un de ses inhibiteurs spécifiques, la cystatine C, dans les lysats obtenus à partir de testicule (Wong et al., 2004).

Dans les cellules MCF-10A, la modification de morphologie et l'AMT participeraient à la modulation de l'invasion cellulaire. Les modifications d'expression de gènes conduisant à ces modifications peuvent être liées au potentiel du Cd²⁺ à moduler l'épigénome en modifiant la méthylation de l'ADN, l'expression des microRNA et ou encore les histones (Venza et al., 2014). Ces modifications épigénétiques pourraient jouer sur l'expression des gènes et des protéines en entraînant par exemple la surexpression de protéines impliquées dans des mécanismes de la progression tumorale. Dans les cellules non-cancéreuses MCF 10A exposées 40 semaines à 2,5 μ M, une hypométhylation globale de l'ADN est observée conduisant à la surexpression des oncogènes c-myc et k-ras (Benbrahim-Tallaa et al., 2009). Cette hypométhylation pourrait permettre également la surexpression de TRPM7. Dans les cellules cancéreuses de sein, l'exposition aiguë au Cd²⁺ (0,5 μ M pendant 48 heures) active les voies MAPK et Akt induisant une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses (Wei et al., 2015).

Dans les cellules hTERT-HPNE non-cancéreuses, l'exposition au Cd^{2+} (1 μM pendant 30 semaines) augmente l'invasion *via* TRPM7 mais le mécanisme n'a pas été élucidé. Dans la littérature, pour l'implication du Cd^{2+} dans la cancérogénèse pancréatique, trois mécanismes sont proposés : le Cd^{2+} peut altérer le métabolisme oxydatif de la cellule, perturber les voies apoptotiques, ou induire des modifications épigénétiques qui joueraient sur l'expression des gènes et potentiellement celle de *trpm7* (Buha et al., 2017). Dans le mélanome, le Cd^{2+} entraîne la méthylation et la diminution d'expression du gène *p16/INK4A*, qui est fréquemment retrouvé muté dans les lésions précoces d'ACP (Venza et al., 2015). De plus, dans des modèles de souris génétiquement modifiées pour ne plus exprimer les facteurs de transcription clés de l'EMT, *Snail* et *Slug*, la dissémination métastatique des cellules cancéreuses d'ACP n'est pas affectée, ce qui montre que cette transition n'est pas indispensable dans la progression cancéreuse de l'ACP (Zheng et al., 2015).

TRPM7 est donc impliqué dans la transformation des cellules non-cancéreuses vers un phénotype invasif. Il serait intéressant de savoir si TRPM7 est le facteur causal des phénomènes observés. Pour répondre à cette question, nous pourrions réaliser, sur des cellules où l'on a inhibé l'expression de TRPM7 de manière stable avec un shRNA, un traitement chronique au Cd^{2+} . Nous pourrions aussi traiter les cellules mutées n'exprimant plus le domaine kinase endogène (grâce au système CRISPR-Cas9) pour explorer son rôle.

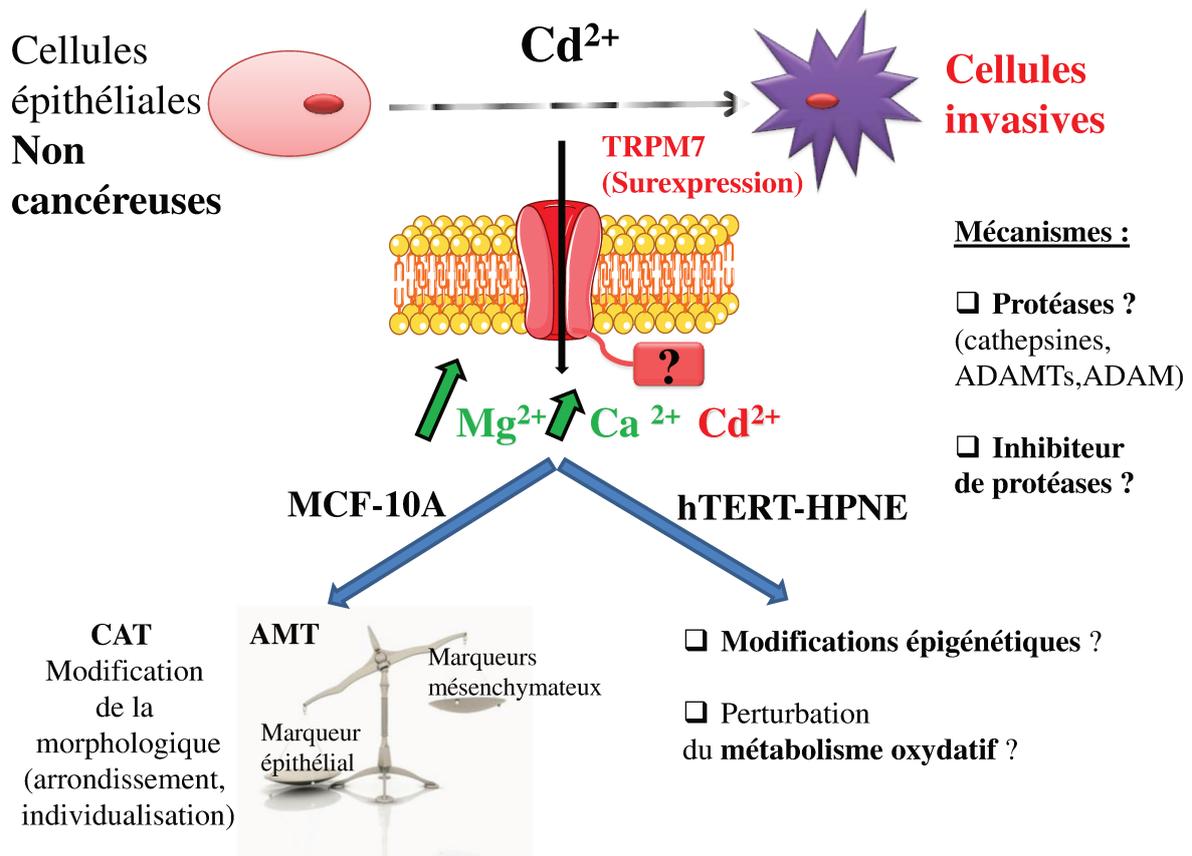


Figure 53 : Conclusion sur les mécanismes impliquant TRPM7 dans l'invasion cellulaire stimulée par le traitement au Cd²⁺.

CONCLUSION ET **PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse fait suite aux premiers travaux au laboratoire sur l'implication de TRPM7 dans les mécanismes migratoires dans l'ACP. L'objectif était d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes métastatiques impliquant le canzyne TRPM7 et plus particulièrement dans l'invasion cellulaire qui est un événement limitant dans le développement des métastases, qui est la principale cause de mortalité dans le cancer.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons apporté des connaissances supplémentaires sur le rôle de TRPM7 dans l'invasion des cellules invasives d'ACP qui est un cancer qui induit des métastases de manière importante et précoce. Ces travaux décrivent de nouveaux mécanismes sous-jacents impliquant TRPM7 et plus particulièrement son domaine kinase, MMP-2, Hsp90 α et le Mg²⁺ spécifiquement dans des modèles cellulaires cancéreux. TRPM7 interagit de manière directe avec Hsp90 α et influe sur la phosphorylation des résidus sérines d'Hsp90 α probablement *via* le domaine kinase. Ces phosphorylations pourraient moduler la sécrétion d'Hsp90 α . L'homéostasie magnésique est principalement régulée par TRPM7 dans ces cellules. Il pourrait participer au mécanisme selon plusieurs voies : en activant la kinase de TRPM7, en induisant des modifications de l'association d'Hsp90 α avec ses homologues ou d'autres protéines partenaires ou par d'autres voies.

Dans les modèles de cellules non-cancéreuses, TRPM7 est impliqué dans l'acquisition d'un phénotype invasif impliquant la surexpression de TRPM7. Cette surexpression peut être observée à la suite de traitement chronique avec un polluant environnemental carcinogène probable, le Cd²⁺. TRPM7 régule la transition vers un phénotype invasif en modulant l'homéostasie magnésique et calcique, la morphologie cellulaire et l'expression des marqueurs de transition en faveur des protéines mésenchymateuses dans les cellules MCF-10A. Dans les hTERT-HPNE, le mécanisme n'est pas élucidé mais pourrait impliquer des régulations épigénétiques d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans l'invasion.

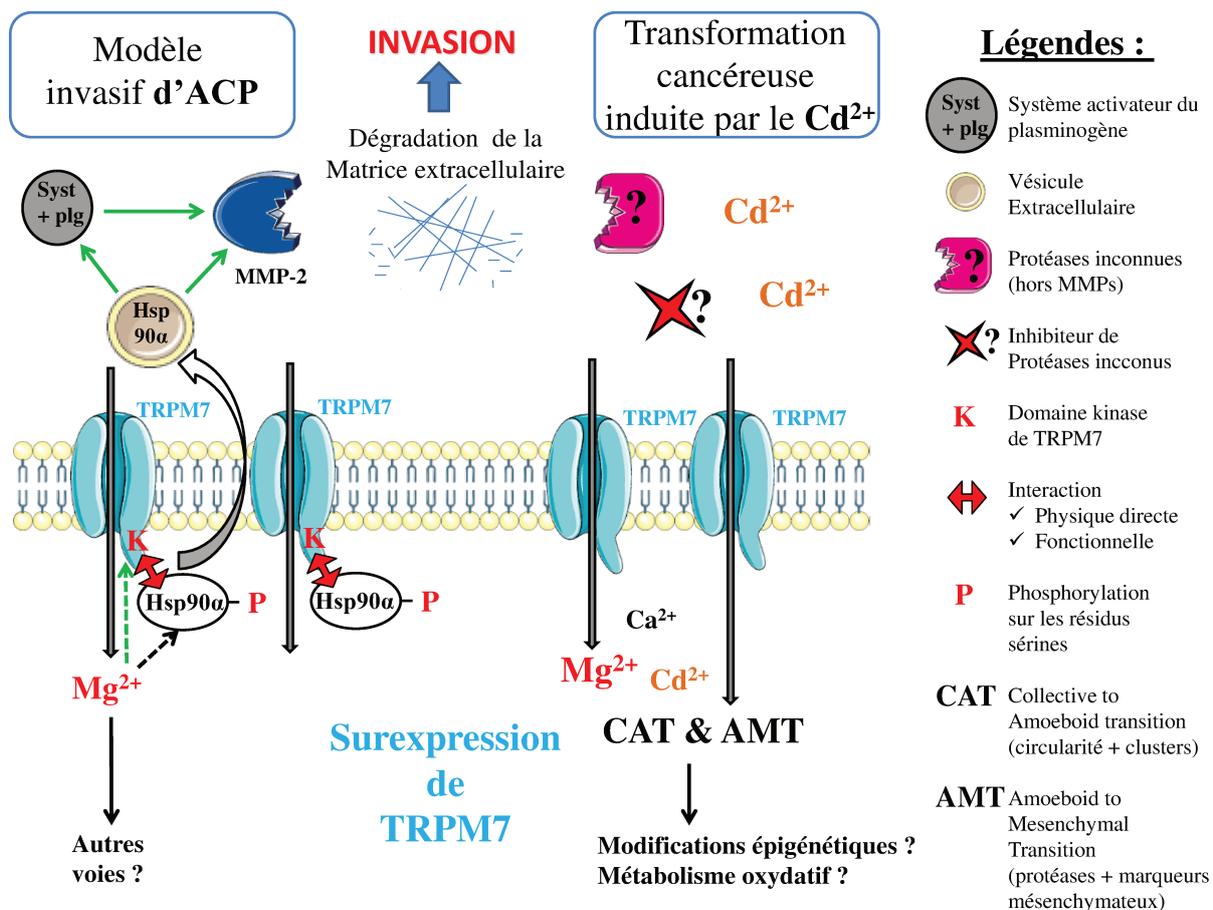


Figure 54 : Schéma de conclusion générale sur le rôle de TRPM7 dans l'invasion cellulaire.

Nous avons montré que TRPM7 régule l'invasion basale d'un modèle cellulaire invasif mais aussi en tant que déclencheur permettant aux cellules non-cancéreuses de devenir invasives. Il serait donc intéressant de savoir s'il est impliqué dans le développement des lésions PanINs précurseur de l'ACP en lien avec d'autres acteurs moléculaires comme par exemple l'oncogène Kras ou les mucines.

TRPM7 a un rôle spécifiquement dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques et n'est pas impliqué dans ce mécanisme dans les cellules non-cancéreuses. L'invasion est un mécanisme clé de la formation des métastases, qui sont fréquemment retrouvées chez les patients atteints d'ACP. TRPM7 serait donc une cible thérapeutique intéressante dans le cadre de l'ACP. Néanmoins, son expression étant ubiquitaire, développer des thérapies sur ce canal dans sa totalité pourrait entraîner de nombreux effets secondaires. Il serait

judicieux de cibler plutôt le domaine kinase qui n'empêcherait pas à la protéine d'exercer sa fonction canal. Cette fonction canal permet la régulation de l'homéostasie calcique et magnésique qui intervient dans de nombreux processus physiopathologiques. Pour explorer d'une autre manière le rôle de la kinase de TRPM7, nous pourrions modifier son activité grâce à des agents pharmacologiques. L'absence d'inhibiteurs pharmacologiques spécifique de la kinase de TRPM7 nécessite la mise au point de nouvelles molécules. L'assemblage en dimère de dimère et la capacité de phosphoryler à la fois les résidus sérines et thréonines sont des particularités propres à la kinase de TRPM7 la distinguant des autres membres de la famille des α -kinases. Ces particularités fonctionnelles pourraient être liées à des différences structurales qui pourraient permettre le développement d'inhibiteurs spécifiques. Après mise au point de nouvelles molécules sur modèles cellulaires classiques, ces nouveaux inhibiteurs pourraient être testés sur la capacité métastatique *in vitro* en culture 3D ou *in vivo* dans des modèles de xénogreffes sur animaux.

Aller plus loin dans la caractérisation de l'interaction entre TRPM7 et Hsp90 α afin de pouvoir développer dans le cadre de l'ACP des bloqueurs de cette interaction serait une perspective possible. Plusieurs techniques sont envisageables : il serait intéressant de déterminer quels sont les domaines d'interaction entre ces deux protéines en utilisant des protéines mutées pour des domaines probables d'interaction. Nous pourrions utiliser les mutants CRISPR-Cas9 pour la kinase et voir si nous observons toujours l'interaction entre TRPM7 et Hsp90 α . La cristallographie pourrait être utilisée afin de savoir si d'autres parties du canal sont impliquées dans cette interaction. Nous pourrions utiliser la spectrométrie de masse sur les immunoprécipitats afin d'identifier de manière plus globale toutes les protéines partenaires fixées à nos protéines d'intérêt. Ces protéines peuvent avoir un rôle dans l'interaction entre nos deux partenaires. Par exemple, l'interaction entre la co-chaperonne Cdc37 et Hsp90 affecte spécifiquement l'interaction entre Hsp90 et les kinases (Bachman et al., 2018).

Pour caractériser de manière plus précise les résidus phosphorylés, nous pourrions effectuer des mutations ponctuelles de résidus dans la levure *S. Cerevisiae* et observer l'effet sur la phosphorylation par la kinase de TRPM7. Cette levure eucaryote est utilisée dans certaines études sur les modifications post-traductionnelles d'Hsp90 α (Prodromou 2016). Certaines phosphorylations connues d'Hsp90 α permettent de moduler ses interactions avec des co-

chaperonnes ou de réguler sa sécrétion. Ces modulations pourraient potentiellement participer aux différents mécanismes aboutissant à une stimulation de l'invasion cellulaire.

Il serait intéressant de voir si les mécanismes démontrés dans l'invasion basale sont transposables au modèle d'exposition chronique au Cd^{2+} et inversement. Est-ce que la kinase de TRPM7 est impliquée dans l'acquisition du phénotype invasif induite par le Cd^{2+} ? Est-ce TRPM7 est impliqué dans l'EMT dans les cellules d'ACP ?

Au laboratoire, nous travaillons également sur un autre modèle de cellules non-cancéreuses, les cellules stellaires pancréatiques. Le travail sur ces cellules permet d'explorer le rôle du microenvironnement cellulaire qui est de plus en étudié dans la cancérogénèse. Lors d'une pancréatite, qui est un facteur de risque important de l'ACP, ces cellules stellaires s'activent et interagissent avec les cellules cancéreuses pancréatiques permettant leur progression. Il serait intéressant d'explorer si l'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules stellaires possiblement *via* TRPM7 par sa fonction canal ou kinase modifie le comportement des cellules cancéreuses et leur phénotype. De plus, déterminer si les cellules stellaires exposées au Cd^{2+} présentent une modification d'expression de TRPM7 permettrait d'explorer l'effet de la pollution environnementale sur l'activation du stroma tumoral.

VALORISATION DES **TRAVAUX**

ARTICLES

Vanlaeys A, Fouquet G, Pasco-Brassart S, Lefebvre T, Rybarczyk P, Kischel P, Hague F, Dhennin-Duthille I, Brassart B, Ouadid-Ahidouch H, and Mathieu G. Cadmium exposure increases TRPM7 expression in epithelial cells leading to enhanced cell migration and invasion (in progress).

Vanlaeys A*, Rybarczyk P*, 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.

REVUE

Gautier M, Perriere M, Monet M, Vanlaeys A, Korichneva I, Dhennin-Duthille I & Ouadid Ahidouch H. Recent advances in oncogenic roles of the TRPM7 channel. *Curr Med Chem* 2016 Aug 23 ; (36):4092-4107.

COMMUNICATIONS ORALES

Vanlaeys A, Neve B, Souidi M, Van Seuningen I, Ouadid-Ahidouch H, Jonckheere N & Gautier M. *Strategy of inhibition of TRPM7 channel in pancreatic cancer cells by CRISPR/Cas9 technique- 3^{ème} Journée scientifique de l'association française de recherche pour le cancer du pancréas (AFRCP) - Lille - 20 novembre 2018*

Vanlaeys A, Fouquet G, Dupont-Deshorgues A, Dhennin-Duthille I, Brassart-Pasco S, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *TRPM7 régule l'invasion des cellules épithéliales mammaires et pancréatiques non cancéreuses exposées au cadmium- 2^{ème} Journée Nationale « Canaux Ioniques et Cancer » – Poitiers – 7 juillet 2018*

Vanlaeys A, Rybarczyk P, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Dupont-Deshorgue A, Chatelain D, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *Régulation de l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques humaines par TRPM7 via la voie protéolytique MMP-2/uPA/Hsp90 α - Journée des Jeunes Chercheurs de la SFR CAP Santé - Reims - 31 mars 2017*

Vanlaeys A, Rybarczyk P, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Dupont-Deshorgue A, Chatelain D, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *TRPM7 is expressed in metastatic lymph nodes and promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell invasion through MMP-2/uPA/Hsp90 secretions - Journée Amiénoise de Recherche en Santé (JARS) - CHU Amiens Picardie - 06 octobre 2016*

POSTERS

Vanlaeys A, Lefebvre T, Dhennin-Duthille I, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *Implication du domaine kinase du canal TRPM7 et de Hsp90α dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatique* - **Journée Amiénoise de Recherche en Santé (JARS) - CHU Amiens Picardie Jules Verne - 16 novembre 2017**

Vanlaeys A, Lefebvre T, Dhennin-Duthille I, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *Implication du domaine kinase du canal TRPM7 et de Hsp90α dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques* – **1^{ère} Journée Nationale « Canaux Ioniques et Cancer » - Amiens - 14 novembre 2017 - Obtention du prix du Cancéropôle Nord-Ouest**

Vanlaeys A, Lefebvre T, Dhennin-Duthille I, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *Implication du domaine kinase du canal TRPM7 et de Hsp90α dans l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques* - **3^{ème} Journée scientifique de l'association française de recherche pour le cancer du pancréas (AFRCP) - Lille - 20 septembre 2017**

Vanlaeys A, Rybarczyk P, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Dupont-Deshorgue A, Chatelain D, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *Régulation de l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques humaines par TRPM7 via la voie protéolytique MMP-2/uPA/Hsp90α* - **10^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest - Deauville - 10/12 mai 2017**

Vanlaeys A, Fouquet G, Dupont-Deshorgues A, Dhennin-Duthille I, Brassart-Pasco S, Ouadid-Ahidouch H & Gautier M. *The transient receptor potential melastatin related-7 (TRPM7) regulates invasiveness in normal mammary epithelial cells exposed to cadmium* - **Meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society - Dublin, Ireland - 29/ 31 juillet 2016**

MOBILITE

Partenariat avec l'Equipe 5 « Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales » de l'UMR-S 1172 Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert / mai-juin 2017 – Lille / *Inhibition of TRPM7 channel in pancreatic cancer cells by CRISPR/Cas9 technique* – **Appel à projet « TRANSFERT DE TECHNOLOGIE 2016-2017 » financé par l'association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas (Encadrants : Dr Neve Bernadette / Dr Souidi Mouloud / Dr Jonckheere Nicolas)**

Partenariat avec l'Equipe 1 « Matrice extracellulaire, Cancer et Cibles thérapeutiques » de l'UMR CNRS 7369 MEDyC (Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire) / 24 – 28 octobre 2016 – Reims / *Formation en zymographie et utilisation de la microscopie confocale* (Encadrants : Dr Brassart Bertrand / Dr Brassart-Pasco Sylvie/ Dupont-Desorgues Aurélie)

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages:

Drake, Mitchell, Richardson, Tibbitts, Vogl, Duparc, CO. Gray's Atlas d'anatomie humaine: Elsevier Health Sciences; 2017.

Hille. Ionic Channels of Excitable Membranes: Sinauer; 2001.

Tortora, Derrickson. Manuel d'anatomie et de physiologie humaines: De Boeck supérieur; 2017.

Widmanier. Physiologie humaine Les mécanismes du fonctionnement de l'organisme 4ème édition ed2004.

Sites Internet:

Forget A. We've made 'smart egg-cartons' to transport cells to cure diabetes. 2018; Available from: <http://theconversation.com/weve-made-smart-egg-cartons-to-transport-cells-to-cure-diabetes-92920>.

Pitau. Adénocarcinome du pancréas. Centre hépato-biliaire Paul Brousse; 2017; Available from: <http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies/cancers/adenocarcinome-pancreas.html>.

Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD), Cancer du pancréas (Dernière mise à jour le 25/06/2018
<http://www.tncd.org/>

Institut National du Cancer (INCA), 2018
<http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Environnement/La-pollution-atmospherique#toc-pollution-atmosph-rique-et-risque-de-cancers>

<http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Environnement/Les-pesticides>

Revues et articles :

Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):863-77.

Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif*. 2007 Dec;40(6):849-65.

Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 22;18(7).

Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R, Neoptolemos JP. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2004 Nov;91(11):1410-27.

Almholt K, Johnsen M. Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2003;162:31-42.

Altura BM, Altura BT. Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscles: relationship to some vascular diseases. *Fed Proc*. 1981 Oct;40(12):2672-9.

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Jan 20;57(1):25-40.

Aquino J-P, Bérard A., Gaspard F., Kenigsberg P-A., Mollard J., Simzac A-B. Maladie d'alzheimer et autres maladies neurodegeneratives : première de cohérence Association France Alzheimer / Fondation Médéric Alzheimer 2013.

Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015 May-Jul;44-46:247-54.

Bachman AB, Keramisanou D, Xu W, Beebe K, Moses MA, Vasantha Kumar MV, et al. Phosphorylation induced cochaperone unfolding promotes kinase recruitment and client class-specific Hsp90 phosphorylation. *Nat Commun*. 2018 Jan 17;9(1):265.

Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016 Mar 3;531(7592):47-52.

Baldoli E, Maier JA. Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 2012 Mar;15(1):47-57.

Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Jun;3(2):105-19.

Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. 2002 Dec;2(12):897-909.

Barrott JJ, Haystead TA. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J*. 2013 Mar;280(6):1381-96.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990 Dec 20-27;348(6303):699-704.

Beatty GL, Winograd R, Evans RA, Long KB, Luque SL, Lee JW, et al. Exclusion of T Cells From Pancreatic Carcinomas in Mice Is Regulated by Ly6C(low) F4/80(+) Extratumoral Macrophages. *Gastroenterology*. 2015 Jul;149(1):201-10.

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.

Becker B, Multhoff G, Farkas B, Wild PJ, Landthaler M, Stolz W, et al. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp Dermatol*. 2004 Jan;13(1):27-32.

Beesetty P, Wiczerzak KB, Gibson JN, Kaitsuka T, Luu CT, Matsushita M, et al. Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry. *Sci Rep*. 2018 Feb 14;8(1):3023.

Benbrahim-Tallaa L, Tokar EJ, Diwan BA, Dill AL, Coppin JF, Waalkes MP. Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype. *Environ Health Perspect*. 2009 Dec;117(12):1847-52.

Bennett ES, Smith BA, Harper JM. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch*. 2004 Mar;447(6):908-14.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.

Bessac BF, Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol*. 2007 Aug 1;582(Pt 3):1073-86.

Bobrov E, Skobeleva N, Restifo D, Beglyarova N, Cai KQ, Handorf E, et al. Targeted delivery of chemotherapy using HSP90 inhibitor drug conjugates is highly active against pancreatic cancer models. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):4399-409.

Bochatay L, Girardin M, Bichard P, Frossard JL. [Pancreatic cancer in 2014: screening and epidemiology]. *Rev Med Suisse*. 2014 Sep 3;10(440):1582-5.

Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R. DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4100-5.

Bonito B, Sauter DR, Schwab A, Djamgoz MB, Novak I. KCa3.1 (IK) modulates pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation: anomalous effects on TRAM-34. *Pflugers Arch*. 2016 Nov;468(11-12):1865-75.

Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010 Jun;20(3):161-8.

Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JK, Djamgoz MB. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jan;101(2):149-60.

Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, et al. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Jan 29;264(1-2):102-8.

Bramhall SR. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. From molecular science to a clinical application. *Int J Pancreatol.* 1997 Feb;21(1):1-12.

Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S, et al. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene.* 2011 Apr 28;30(17):2070-6.

Brunner TB, Scott-Brown M. The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma. *Radiat Oncol.* 2010 Jul 8;5:64.

Buccione R, Caldieri G, Ayala I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):137-49.

Buha A, Wallace D, Matovic V, Schweitzer A, Oluic B, Micic D, et al. Cadmium Exposure as a Putative Risk Factor for the Development of Pancreatic Cancer: Three Different Lines of Evidence. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1981837.

Bunger S, Laubert T, Roblick UJ, Habermann JK. Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer: a current overview. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Mar;137(3):375-89.

Burris H, Storniolo AM. Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* 1997 Jan;33 Suppl 1:S18-22.

Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. Metals and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013 Mar;18(1):63-73.

Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, et al. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol.* 2014 Jan;16(1):55-65.

Cal S, Lopez-Otin C. ADAMTS proteases and cancer. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:77-85.

Campbell TM, Main MJ, Fitzgerald EM. Functional expression of the voltage-gated Na(+)-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *J Cell Sci.* 2013 Nov 1;126(Pt 21):4939-49.

Cao Q, Liu F, Ji K, Liu N, He Y, Zhang W, et al. MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Feb 13;36(1):29.

Cao R, Meng Z, Liu T, Wang G, Qian G, Cao T, et al. Decreased TRPM7 inhibits activities and induces apoptosis of bladder cancer cells via ERK1/2 pathway. *Oncotarget.* 2016 Nov 8;7(45):72941-60.

Castiglioni S, Cazzaniga A, Trapani V, Cappadone C, Farruggia G, Merolle L, et al. Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci Rep.* 2015 Nov 13;5:16538.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):118-32.

Cazzaniga A, Moscheni C, Trapani V, Wolf FI, Farruggia G, Sargenti A, et al. The different expression of TRPM7 and MagT1 impacts on the proliferation of colon carcinoma cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci Rep.* 2017 Jan 17;7:40538.

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.

Chantome A, Girault A, Potier M, Collin C, Vaudin P, Pages JC, et al. KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res.* 2009 Dec 10;315(20):3620-30.

Chantome A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Gueguinou M, et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res.* 2013 Aug 1;73(15):4852-61.

Chen CC, Chen LL, Li CP, Hsu YT, Jiang SS, Fan CS, et al. Myeloid-derived macrophages and secreted HSP90alpha induce pancreatic ductal adenocarcinoma development. *Oncoimmunology.* 2018;7(5):e1424612.

Chen HC, Su LT, Gonzalez-Pagan 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.

Chen JP, Luan Y, You CX, Chen XH, Luo RC, Li R. TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca(2+) influx. *Cell Calcium.* 2010 May;47(5):425-32.

Chen KH, Xu XH, Liu Y, Hu Y, Jin MW, Li GR. TRPM7 channels regulate proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Physiol*. 2014 Jan;229(1):60-7.

Chen WL, Barszczyk A, Turlova E, Deurloo M, Liu B, Yang BB, et al. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16321-40.

Chen WL, Turlova E, Sun CL, Kim JS, Huang S, Zhong X, et al. Xyloketal B suppresses glioblastoma cell proliferation and migration in vitro through inhibiting TRPM7-regulated PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways. *Mar Drugs*. 2015 Apr 22;13(4):2505-25.

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.

Chen Z, Zhu Y, Dong Y, Zhang P, Han X, Jin J, et al. Overexpression of TrpC5 promotes tumor metastasis via the HIF-1alpha-Twist signaling pathway in colon cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Oct 1;131(19):2439-50.

Chiang PC, Chou RH, Chien HF, Tsai T, Chen CT. Chloride intracellular channel 4 involves in the reduced invasiveness of cancer cells treated by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 2013 Jan;45(1):38-47.

Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, et al. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):418-27.

Choi KY, Swierczewska M, Lee S, Chen X. Protease-activated drug development. *Theranostics*. 2012;2(2):156-78.

Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA. Sensitivity of TRPM7 channels to Mg²⁺ characterized in cell-free patches of Jurkat T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):C1642-51.

Chubanov V, Ferioli S, Gudermann T. Assessment of TRPM7 functions by drug-like small molecules. *Cell Calcium*. 2017 Nov;67:166-73.

Chubanov V, Mederos y Schnitzler M, Meissner M, Schafer S, Abstiens K, Hofmann T, et al. Natural and synthetic modulators of SK (K_{Ca})₂ potassium channels inhibit magnesium-dependent activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7. *Br J Pharmacol*. 2012 Jun;166(4):1357-76.

Chubanov V, Schlingmann KP, Waring J, Heinzinger J, Kaske S, Waldegger S, et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *J Biol Chem*. 2007 Mar 9;282(10):7656-67.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003 Dec 4;426(6966):517-24.

Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, et al. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J*. 2006 Jan 25;25(2):290-301.

Clark K, Middelbeek J, Dorovkov MV, Figdor CG, Ryazanov AG, Lasonder E, et al. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett*. 2008 Sep 3;582(20):2993-7.

Clark K, Middelbeek J, Lasonder E, Dulyaninova NG, Morrice NA, Ryazanov AG, et al. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *J Mol Biol*. 2008 May 9;378(4):790-803.

Clark K, Middelbeek J, Morrice NA, Figdor CG, Lasonder E, van Leeuwen FN. Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PLoS One*. 2008 Mar 26;3(3):e1876.

Clark SA, Boass A, Toverud SU. Effects of high dietary contents of calcium and phosphorus on mineral metabolism and growth of vitamin D-deficient suckling and weaned rats. *Bone Miner*. 1987 Jul;2(4):257-70.

Correia AL, Mori H, Chen EI, Schmitt FC, Bissell MJ. The hemopexin domain of MMP3 is responsible for mammary epithelial invasion and morphogenesis through extracellular interaction with HSP90beta. *Genes Dev*. 2013 Apr 1;27(7):805-17.

Crawley SW, Cote 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.

Crottes D, Rapetti-Mauss R, Alcaraz-Perez F, Tichet M, Gariano G, Martial S, et al. SIGMAR1 Regulates Membrane Electrical Activity in Response to Extracellular Matrix Stimulation to Drive Cancer Cell Invasiveness. *Cancer Res.* 2016 Feb 1;76(3):607-18.

Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW, Jr., et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene.* 2014 May 1;33(18):2307-16.

de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem.* 2015 Sep 24;58(18):7093-118.

Deason-Towne F, Perraud AL, Schmitz C. The Mg²⁺ transporter MagT1 partially rescues cell growth and Mg²⁺ uptake in cells lacking the channel-kinase TRPM7. *FEBS Lett.* 2011 Jul 21;585(14):2275-8.

Deason-Towne F, Perraud AL, Schmitz C. Identification of Ser/Thr phosphorylation sites in the C2-domain of phospholipase C gamma2 (PLCgamma2) using TRPM7-kinase. *Cell Signal.* 2012 Nov;24(11):2070-5.

Deb TB, Zuo AH, Wang Y, Barndt RJ, Cheema AK, Sengupta S, et al. Pnck induces ligand-independent EGFR degradation by probable perturbation of the Hsp90 chaperone complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 May;300(5):C1139-54.

DeCoursey TE. Hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells. *Biophys J.* 1991 Nov;60(5):1243-53.

Del Villano BC, Brennan S, Brock P, Bucher C, Liu V, McClure M, et al. Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin Chem.* 1983 Mar;29(3):549-52.

Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr Genomics.* 2011 Mar;12(1):15-24.

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.

Demols A, Peeters M, Polus M, Marechal R, Gay F, Monsaert E, et al. Gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in gemcitabine refractory advanced pancreatic adenocarcinoma: a phase II study. *Br J Cancer.* 2006 Feb 27;94(4):481-5.

Desai BN, Krapivinsky G, Navarro B, Krapivinsky L, Carter BC, Febvay S, et al. Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis. *Dev Cell.* 2012 Jun 12;22(6):1149-62.

Destaing O, Petropoulos C, Albiges-Rizo C. Coupling between acto-adhesive machinery and ECM degradation in invadosomes. *Cell Adh Migr.* 2014;8(3):256-62.

Diaz-Tocados JM, Herencia C, Martinez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodriguez-Ortiz ME, Vergara N, et al. Magnesium Chloride promotes Osteogenesis through Notch signaling activation and expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Sci Rep.* 2017 Aug 10;7(1):7839.

Donet M, Brassart-Pasco S, Salesse S, Maquart FX, Brassart B. Elastin peptides regulate HT-1080 fibrosarcoma cell migration and invasion through an Hsp90-dependent mechanism. *Br J Cancer.* 2014 Jul 8;111(1):139-48.

Dong D, Jia L, Zhang L, Ma N, Zhang A, Zhou Y, et al. Periostin and CA242 as potential diagnostic serum biomarkers complementing CA19.9 in detecting pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2018 Jun 26.

Dorovkov MV, Beznosov SN, Shah S, Kotlianskaia L, Kostiukova AS. [Effect of mutations imitating the phosphorylation by TRPM7 kinase on the function of the N-terminal domain of tropomodulin]. *Biofizika.* 2008 Nov-Dec;53(6):943-9.

Dorovkov MV, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):50643-6.

Dou Y, Li Y, Chen J, Wu S, Xiao X, Xie S, et al. Inhibition of cancer cell proliferation by midazolam by targeting transient receptor potential melastatin 7. *Oncol Lett.* 2013 Mar;5(3):1010-6.

Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, Grindlay J, van den Berghe PV, von Thun A, et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev Cell.* 2012 Jan 17;22(1):131-45.

Drake RL, Mitchell AVW, Richardson PE, Tibbitts R, Vogl AW, Duparc F, et al. *Gray's Atlas d'anatomie humaine: Elsevier Health Sciences; 2017.*

Driffort V, Gillet L, Bon E, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Joulin V, et al. Ranolazine inhibits Nav1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Mol Cancer*. 2014 Dec 11;13:264.

Du C, Chen L, Zhang H, Wang Z, Liu W, Xie X, et al. Caveolin-1 limits the contribution of BKCa channel to MCF-7 breast cancer cell proliferation and invasion. *Int J Mol Sci*. 2014 Nov 12;15(11):20706-22.

Du C, Zheng Z, Li D, Chen L, Li N, Yi X, et al. BKCa promotes growth and metastasis of prostate cancer through facilitating the coupling between α 3 integrin and FAK. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):40174-88.

Dulong C, Fang YJ, Gest C, Zhou MH, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG, et al. The small GTPase RhoA regulates the expression and function of the sodium channel Nav1.5 in breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2014 Feb;44(2):539-47.

Echeverria PC, Bernthaler A, Dupuis P, Mayer B, Picard D. An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS One*. 2011;6(10):e26044.

Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W, et al. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. 2000 Jan 1;85(1):14-20.

Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2014 Aug 26;111(5):817-22.

Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol*. 2004 Jun;6(6):507-14.

Falasca M, Kim M, Casari I. Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1865(2):123-32.

Faouzi M, Kilch T, Horgen FD, Fleig A, Penner R. The TRPM7 channel kinase regulates store-operated calcium entry. *J Physiol*. 2017 May 15;595(10):3165-80.

Farrow B, Albo D, Berger DH. The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2008 Oct;149(2):319-28.

Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 1977 Aug 26;197(4306):893-5.

Flores-Tellez TN, Lopez TV, Vasquez Garzon VR, Villa-Trevino S. Co-Expression of Ezrin-CLIC5-Podocalyxin Is Associated with Migration and Invasiveness in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131605.

Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kellsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26(3):159-78.

Fourbon Y, Gueguinou M, Felix R, Constantin B, Uguen A, Fromont G, et al. Ca(2+) protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity. *Sci Rep*. 2017 Oct 27;7(1):14199.

Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 1;11(15):5381-9.

Fraser SP, Hemsley F, Djamgoz MB. Caffeic acid phenethyl ester: Inhibition of metastatic cell behaviours via voltage-gated sodium channel in human breast cancer in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Feb;71:111-8.

Fraser SP, Peters A, Fleming-Jones S, Mukhey D, Djamgoz MB. Resveratrol: inhibitory effects on metastatic cell behaviors and voltage-gated Na(+) channel activity in rat prostate cancer in vitro. *Nutr Cancer*. 2014;66(6):1047-58.

Fu S, Hirte H, Welch S, Ilenchuk TT, Lutes T, Rice C, et al. First-in-human phase I study of SOR-C13, a TRPV6 calcium channel inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2017 Jun;35(3):324-33.

Fujiwara Y, Minor DL, Jr. X-ray crystal structure of a TRPM assembly domain reveals an antiparallel four-stranded coiled-coil. *J Mol Biol*. 2008 Nov 21;383(4):854-70.

Fukushima H, Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Min Y, Horiuchi S, et al. Association of matrilysin mRNA expression with K-ras mutations and progression in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 2001 Jul;22(7):1049-52.

Futakawa N, Kimura W, Yamagata S, Zhao B, Ilsoo H, Inoue T, et al. Significance of K-ras mutation and CEA level in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000;7(1):63-71.

Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M, Wang Z. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2010 May;23(5):1293-9.

Gao SL, Kong CZ, Zhang Z, Li ZL, Bi JB, Liu XK. TRPM7 is overexpressed in bladder cancer and promotes proliferation, migration, invasion and tumor growth. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):1967-76.

Garcia-Esquinas E, Pollan M, Tellez-Plaza M, Francesconi KA, Goessler W, Guallar E, et al. Cadmium exposure and cancer mortality in a prospective cohort: the strong heart study. *Environ Health Perspect*. 2014 Apr;122(4):363-70.

Garnier C, Barbier P, Devred F, Rivas G, Peyrot V. Hydrodynamic properties and quaternary structure of the 90 kDa heat-shock protein: effects of divalent cations. *Biochemistry*. 2002 Oct 1;41(39):11770-8.

Gautier M, Perriere M, Monet M, Vanlaeys A, Korichneva I, Dhennin-Duthille I, et al. Recent Advances in Oncogenic Roles of the TRPM7 Chanzyme. *Curr Med Chem*. 2016;23(36):4092-107.

Giannelli G, Antonaci S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications. *Histol Histopathol*. 2002 Jan;17(1):339-45.

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, et al. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2009 Mar 27;284(13):8680-91.

Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol*. 2018;8:145.

Gray JW. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*. 2003 Jul;4(1):4-6.

Gress TM, Muller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Adler G. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 1995 Aug 9;62(4):407-13.

Gueder N, Allan G, Telliez MS, Hague F, Fernandez JM, Sanchez-Fernandez EM, et al. sp(2) - Iminosugar alpha-glucosidase inhibitor 1-C-octyl-2-oxa-3-oxocastanospermine specifically affected breast cancer cell migration through Stim1, beta1-integrin, and FAK signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2017 Dec;232(12):3631-40.

Gueguinou M, Harnois T, Crottes D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36168-84.

Gueguinou M, Crottes D, Chantome A, Rapetti-Mauss R, Potier-Cartereau M, Clarysse L, et al. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca(2+) homeostasis. *Oncogene*. 2017 Jun 22;36(25):3640-7.

Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Perez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):291-302.

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*. 2009 Sep;297(3):C493-502.

Guilbert A, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Rybarczyk P, Sahni J, Sevestre H, et al. 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.

Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):679-95.

Ha YS, Kim YY, Yu NH, Chun SY, Choi SH, Lee JN, et al. Down-regulation of transient receptor potential melastatin member 7 prevents migration and invasion of renal cell carcinoma cells via inactivation of the Src and Akt pathway. *Investig Clin Urol*. 2018 Jul;59(4):263-74.

Haeno H, Gonen M, Davis MB, Herman JM, Iacobuzio-Donahue CA, Michor F. Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):362-75.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hanano T, Hara Y, Shi J, Morita H, Umebayashi C, Mori E, et al. 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.

Hance MW, Dole K, Gopal U, Bohonowych JE, Jezierska-Drutel A, Neumann CA, et al. Secreted Hsp90 is a novel regulator of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37732-44.

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.

Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schonekas H, Rost A, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3946-52.

Hermosura MC, Monteilh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM. *J Physiol*. 2002 Mar 1;539(Pt 2):445-58.

Hill RP, Chambers AF, Ling V, Harris JF. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science*. 1984 Jun 1;224(4652):998-1001.

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*: Sinauer; 2001.

Hinzpeter A, Lipecka J, Brouillard F, Baudoin-Legros M, Dadlez M, Edelman A, et al. Association between Hsp90 and the ClC-2 chloride channel upregulates channel function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Jan;290(1):C45-56.

Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*. 2006 Apr;10(4):511-8.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2000 Jul 1;87(1):12-9.

Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, et al. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J*. 2001 Jul 16;20(14):3800-10.

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, et al. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6957-67.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Aug;6(8):2969-72.

Huang J, Furuya H, Faouzi M, Zhang Z, Monteilh-Zoller M, Kawabata KG, et al. Inhibition of TRPM7 suppresses cell proliferation of colon adenocarcinoma in vitro and induces hypomagnesemia in vivo without affecting azoxymethane-induced early colon cancer in mice. *Cell Commun Signal*. 2017 Aug 15;15(1):30.

Huang SY, Tsai ML, Chen GY, Wu CJ, Chen SH. A systematic MS-based approach for identifying in vitro substrates of PKA and PKG in rat uteri. *J Proteome Res*. 2007 Jul;6(7):2674-84.

Imamura T, Ohshio G, Mise M, Harada T, Suwa H, Okada N, et al. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124(2):65-72.

Inoue H, Murayama T, Tashiro M, Sakurai T, Konishi M. Mg²⁺- and ATP-dependent inhibition of transient receptor potential melastatin 7 by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2014 Jul;72:257-66.

Inoue K, Xiong ZG. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. *Cardiovasc Res*. 2009 Aug 1;83(3):547-57.

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J*. 2001 Sep 3;20(17):4782-93.

Jacob A, Prekeris R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:4.

Jelassi B, Chantome A, Alcaraz-Perez F, Baroja-Mazo A, Cayuela ML, Pelegrin P, et al. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*. 2011 May 5;30(18):2108-22.

Jia D, Yan M, Wang X, Hao X, Liang L, Liu L, et al. Development of a highly metastatic model that reveals a crucial role of fibronectin in lung cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer*. 2010 Jul 9;10:364.

Jia L, Liu W, Guan L, Lu M, Wang K. Inhibition of Calcium-Activated Chloride Channel ANO1/TMEM16A Suppresses Tumor Growth and Invasion in Human Lung Cancer. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136584.

Jiang J, Li M, Yue L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol*. 2005 Aug;126(2):137-50.

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*. 2007 Nov 15;67(22):10929-38.

Jiang Y, Gou H, Zhu J, Tian S, Yu L. Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. *Oncol Lett*. 2016 Aug;12(2):1164-70.

Jin C, Ye QH, Yuan FL, Gu YL, Li JP, Shi YH, et al. Involvement of acid-sensing ion channel 1alpha in hepatic carcinoma cell migration and invasion. *Tumour Biol*. 2015 Jun;36(6):4309-17.

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.

Jin J, Wu LJ, Jun J, Cheng X, Xu H, Andrews NC, et al. The channel kinase, TRPM7, is required for early embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):E225-33.

Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, et al. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*. 2003 Aug;9(8):1081-4.

Jonckheere N, Vasseur R, Van Seuning I. The cornerstone K-RAS mutation in pancreatic adenocarcinoma: From cell signaling network, target genes, biological processes to therapeutic targeting. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Mar;111:7-19.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Jan;14(1):105-11.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557-63.

Katz MH, Fleming JB, Bhosale P, Varadhachary G, Lee JE, Wolff R, et al. Response of borderline resectable pancreatic cancer to neoadjuvant therapy is not reflected by radiographic indicators. *Cancer*. 2012 Dec 1;118(23):5749-56.

Kelly T, Mueller SC, Yeh Y, Chen WT. Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol*. 1994 Feb;158(2):299-308.

Kerbel RS, Waghorne C, Korczak B, Lagarde A, Breitman ML. Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells: genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv*. 1988;7(4):597-629.

Khaitan D, Sankpal UT, Weksler B, Meister EA, Romero IA, Couraud PO, et al. Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC Cancer*. 2009 Jul 29;9:258.

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.

Kim BJ. Involvement of melastatin type transient receptor potential 7 channels in ginsenoside Rd-induced apoptosis in gastric and breast cancer cells. *J Ginseng Res*. 2013 Apr;37(2):201-9.

Kim BJ, Jeon JH, Kim SJ, So I, Kim KW. Regulation of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) currents by mitochondria. *Mol Cells*. 2007 Jun 30;23(3):363-9.

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.

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.

Kim JM, Heo K, Choi J, Kim K, An W. The histone variant MacroH2A regulates Ca(2+) influx through TRPC3 and TRPC6 channels. *Oncogenesis*. 2013 Oct 28;2:e77.

Kim TY, Shin SK, Song MY, Lee JE, Park KS. Identification of the phosphorylation sites on intact TRPM7 channels from mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 20;417(3):1030-4.

Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatol*. 2008;8(2):110-25.

Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JPt, et al. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012 Dec 11;22(6):737-50.

Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science*. 1981 Apr 3;212(4490):53-5.

Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee JU, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1998 Feb 15;82(4):642-50.

Kovacs G, Montalbetti N, Franz MC, Graeter S, Simonin A, Hediger MA. Human TRPV5 and TRPV6: key players in cadmium and zinc toxicity. *Cell Calcium*. 2013 Oct;54(4):276-86.

Kozak JA, Cahalan MD. MIC channels are inhibited by internal divalent cations but not ATP. *Biophys J*. 2003 Feb;84(2 Pt 1):922-7.

Kozak JA, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol*. 2002 Aug;120(2):221-35.

Kozak JA, Matsushita M, Nairn AC, Cahalan MD. Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J Gen Physiol*. 2005 Nov;126(5):499-514.

Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*. 2015 Apr-Jun;7(2):17-28.

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.

Kuc N, Doermann A, Shirey C, Lee DD, Lowe CW, Awasthi N, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma cell secreted extracellular vesicles containing ceramide-1-phosphate promote pancreatic cancer stem cell motility. *Biochem Pharmacol*. 2018 Sep 15;156:458-66.

Kuras Z, Yun YH, Chimote AA, Neumeier L, Conforti L. KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e43859.

Kurokawa M, Zhao C, Reya T, Kornbluth S. Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90beta phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5494-506.

Langeslag M, Clark K, Moolenaar WH, van Leeuwen FN, Jalink K. Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. *J Biol Chem*. 2007 Jan 5;282(1):232-9.

Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women. *JAMA*. 2005 Jan 5;293(1):86-9.

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, et al. *herg1* gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res.* 2004 Jan 15;64(2):606-11.

Leanza L, Manago A, Zoratti M, Gulbins E, Szabo I. Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: In vivo evidences. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt B):1385-97.

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.

Lees-Miller SP, Anderson CW. Two human 90-kDa heat shock proteins are phosphorylated in vivo at conserved serines that are phosphorylated in vitro by casein kinase II. *J Biol Chem.* 1989 Feb 15;264(5):2431-7.

Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Curr Biol.* 2017 Feb 6;27(3):392-400.

Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, Kazlauskas A. Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):9364-71.

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.

Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007 Jan;17(1):3-14.

Li M, Du J, Jiang J, Ratzan W, Su LT, Runnels LW, et al. Molecular determinants of Mg²⁺ and Ca²⁺ permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25817-30.

Li Q, Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Sakurai M, Nakamura K, et al. Relationship between urinary cadmium and mortality in habitants of a cadmium-polluted area: a 22-year follow-up study in Japan. *Chin Med J (Engl).* 2011 Nov;124(21):3504-9.

Li S, Li M, Yi X, Guo F, Zhou Y, Chen S, et al. TRPM7 channels mediate the functional changes in cardiac fibroblasts induced by angiotensin II. *Int J Mol Med.* 2017 May;39(5):1291-8.

Li W, Sahu D, Tsen F. Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1823(3):730-41.

Lin X, Yang C, Huang L, Chen M, Shi J, Ouyang L, et al. Upregulation of TRPM7 augments cell proliferation and interleukin-8 release in airway smooth muscle cells of rats exposed to cigarette smoke. *Mol Med Rep.* 2016 Jun;13(6):4995-5004.

Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010 May;44(5):479-96.

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.

Liu M, Inoue K, Leng T, Guo S, Xiong ZG. TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways. *Cell Signal.* 2014 Dec;26(12):2773-81.

Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Oct;31:61-71.

Liu Q, Wang X. Effect of TRPV2 cation channels on the proliferation, migration and invasion of 5637 bladder cancer cells. *Exp Ther Med.* 2013 Nov;6(5):1277-82.

Liu T, Fang Z, Wang G, Shi M, Wang X, Jiang K, et al. Anti-tumor activity of the TRPM8 inhibitor BCTC in prostate cancer DU145 cells. *Oncol Lett.* 2016 Jan;11(1):182-8.

Liu W, Su LT, Khadka DK, Mezzacappa C, Komiya Y, Sato A, et al. TRPM7 regulates gastrulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol.* 2011 Feb 15;350(2):348-57.

Liu Y, Chen C, Li W, Wang Z, Sun Q, Zhou H, et al. TRPM7 Is Required for Normal Synapse Density, Learning, and Memory at Different Developmental Stages. *Cell Rep.* 2018 Jun 19;23(12):3480-91.

Liu YS, Liu YA, Huang CJ, Yen MH, Tseng CT, Chien S, et al. Mechanosensitive TRPM7 mediates shear stress and modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells through Osterix pathway. *Sci Rep*. 2015 Nov 12;5:16522.

Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 1997 Dec 29;139(7):1861-72.

Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005 Jan;7(1):17-23.

Low SE, Amburgey K, Horstick E, Linsley J, Sprague SM, Cui WW, et al. TRPM7 is required within zebrafish sensory neurons for the activation of touch-evoked escape behaviors. *J Neurosci*. 2011 Aug 10;31(32):11633-44.

Lu D, Qu J, Sun L, Li Q, Ling H, Yang N, et al. Ca²⁺/Mg²⁺ homeostasis-related TRPM7 channel mediates chondrocyte hypertrophy via regulation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):5699-705.

Luevano J, Damodaran C. A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2014;33(3):183-94.

Luo Y, Wu JY, Lu MH, Shi Z, Na N, Di JM. 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.

Macpherson IR, Rainero E, Mitchell LE, van den Berghe PV, Speirs C, Dozynkiewicz MA, et al. CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer. *J Cell Sci*. 2014 Sep 15;127(Pt 18):3893-901.

Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006 May 1;11:1696-701.

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.

Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higuera MA, Tarin C, et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8525-30.

Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, et al. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem*. 2005 May 27;280(21):20793-803.

McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*. 2010 Jun 16;10:294.

McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):613-28.

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.

Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, Vaughan CK, et al. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J*. 2004 Mar 24;23(6):1402-10.

Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horssen R, et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res*. 2012 Aug 15;72(16):4250-61.

Mina LA, Sledge GW, Jr. Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jun;8(6):325-32.

Miyata Y, Yahara I. The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J Biol Chem*. 1992 Apr 5;267(10):7042-7.

Mohammed FH, Khajah MA, Yang M, Brackenbury WJ, Luqmani YA. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):73-83.

Mollapour M, Bourboulia D, Beebe K, Woodford MR, Polier S, Hoang A, et al. Asymmetric Hsp90 N domain SUMOylation recruits Aha1 and ATP-competitive inhibitors. *Mol Cell*. 2014 Jan 23;53(2):317-29.

Mollapour M, Tsutsumi S, Kim YS, Trepel J, Neckers L. Casein kinase 2 phosphorylation of Hsp90 threonine 22 modulates chaperone function and drug sensitivity. *Oncotarget*. 2011 May;2(5):407-17.

Mollapour M, Tsutsumi S, Neckers L. Hsp90 phosphorylation, Wee1 and the cell cycle. *Cell Cycle*. 2010 Jun 15;9(12):2310-6.

Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1225-35.

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 Gen Physiol*. 2003 Jan;121(1):49-60.

Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989 Apr;2(4):1313-23.

Motiani RK, Hyzinski-Garcia MC, Zhang X, Henkel MM, Abdullaev IF, Kuo YH, et al. STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch*. 2013 Sep;465(9):1249-60.

Motiani RK, Zhang X, Harmon KE, Keller RS, Matrougui K, Bennett JA, et al. Orai3 is an estrogen receptor alpha-regulated Ca²⁺(+) channel that promotes tumorigenesis. *FASEB J*. 2013 Jan;27(1):63-75.

Moullintraffort L, Bruneaux M, Nazabal A, Allegro D, Giudice E, Zal F, et al. Biochemical and biophysical characterization of the Mg²⁺-induced 90-kDa heat shock protein oligomers. *J Biol Chem*. 2010 May 14;285(20):15100-10.

Mueller SC, Ghersi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M, et al. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):24947-52.

Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, et al. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*. 2013 Jun 20;32(25):3101-10.

Mullooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ. The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2016 Aug 2;17(8):870-80.

Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jun 23;12(7):413-26.

Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 2011 Nov 11;12(11):233.

Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, et al. LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):590-5.

Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, et al. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2009 Feb;156(3):420-31.

Nasulewicz A, Wietrzyk J, Wolf FI, Dzimira S, Madej J, Maier JA, et al. Magnesium deficiency inhibits primary tumor growth but favors metastasis in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 24;1739(1):26-32.

Neel NF, Rossman KL, Martin TD, Hayes TK, Yeh JJ, Der CJ. The RalB small GTPase mediates formation of invadopodia through a GTPase-activating protein-independent function of the RalBP1/RLIP76 effector. *Mol Cell Biol*. 2012 Apr;32(8):1374-86.

Neesse A, Krug S, Gress TM, Tuveson DA, Michl P. Emerging concepts in pancreatic cancer medicine: targeting the tumor stroma. *Onco Targets Ther*. 2013 Dec 18;7:33-43.

Nelson M, Yang M, Millican-Slater R, Brackenbury WJ. Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):32914-29.

Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem.* 2003 May;270(10):2109-19.

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.

Nunez-Villena F, Becerra A, Echeverria C, Briceno N, Porras O, Armisen R, et al. 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.

Ogunrinde A, Pereira RD, Beaton N, Lam DH, Whetstone C, Hill CE. Hepatocellular differentiation status is characterized by distinct subnuclear localization and form of the channel TRPM7. *Differentiation.* 2017 Jul - Aug;96:15-25.

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.

Old WM, Shabb JB, Houel S, Wang H, Coutts KL, Yen CY, et al. Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Mol Cell.* 2009 Apr 10;34(1):115-31.

Oulidi A, Bokhobza A, Gkika D, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Ouafik L, et al. TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion. *PLoS One.* 2013;8(5):e64885.

Paravicini TM, Chubanov V, Gudermann T. TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Aug;44(8):1381-4.

Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium.* 2009 Mar;45(3):300-9.

Penner R, Fleig A. The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol.* 2007(179):313-28.

Perraud AL, Zhao X, Ryazanov AG, Schmitz C. The channel-kinase TRPM7 regulates phosphorylation of the translational factor eEF2 via eEF2-k. *Cell Signal.* 2011 Mar;23(3):586-93.

Person RJ, Tokar EJ, Xu Y, Orihuela R, Ngalame NN, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Dec 1;273(2):281-8.

Peterson LB, Eskew JD, Vielhauer GA, Blagg BS. The hERG channel is dependent upon the Hsp90alpha isoform for maturation and trafficking. *Mol Pharm.* 2012 Jun 4;9(6):1841-6.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol Rev.* 2018 Apr 1;98(2):559-621.

Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J.* 2016 Aug 15;473(16):2439-52.

Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003 Jul;4(7):544-58.

Qin X, Yue Z, Sun B, Yang W, Xie J, Ni E, et al. Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. *Br J Pharmacol.* 2013 Mar;168(6):1294-312.

Qin Y, Liao ZW, Luo JY, Wu WZ, Lu AS, Su PX, et al. Functional characterization of TRPM7 in nasopharyngeal carcinoma and its knockdown effects on tumorigenesis. *Tumour Biol.* 2016 Jul;37(7):9273-83.

Qu W, Tokar EJ, Kim AJ, Bell MW, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro causes acquisition of multiple tumor cell characteristics in human pancreatic epithelial cells. *Environ Health Perspect.* 2012 Sep;120(9):1265-71.

Quanz M, Herbette A, Sayarath M, de Koning L, Dubois T, Sun JS, et al. Heat shock protein 90alpha (Hsp90alpha) is phosphorylated in response to DNA damage and accumulates in repair foci. *J Biol Chem.* 2012 Mar 16;287(12):8803-15.

Quesada V, Ordonez GR, Sanchez LM, Puente XS, Lopez-Otin C. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D239-43.

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.

Ren T, Zhang H, Wang J, Zhu J, Jin M, Wu Y, et al. MCU-dependent mitochondrial Ca²⁺ inhibits NAD(+)/SIRT3/SOD2 pathway to promote ROS production and metastasis of HCC cells. *Oncogene.* 2017 Oct 19;36(42):5897-909.

Restrepo-Angulo I, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J. Ion channels in toxicology. *J Appl Toxicol.* 2010 Aug;30(6):497-512.

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012 Jan 20;148(1-2):349-61.

Riazanova LV, Pavur KS, Petrov AN, Dorovkov MV, Riazanov AG. [Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked to ion channels]. *Mol Biol (Mosk).* 2001 Mar-Apr;35(2):321-32.

Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Aug 1;512(1):1-23.

Rosati A, Basile A, D'Auria R, d'Avenia M, De Marco M, Falco A, et al. BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages. *Nat Commun.* 2015 Nov 2;6:8695.

Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science.* 2001 Feb 9;291(5506):1043-7.

Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):329-36.

Ryazanov AG, Pavur KS, Dorovkov MV. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr Biol.* 1999 Jan 28;9(2):R43-5.

Ryazanova LV, Dorovkov MV, Ansari A, Ryazanov AG. Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3708-16.

Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, et al. TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. *Nat Commun.* 2010;1:109.

Rybarczyk P, Gautier M, Hague F, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Kerr-Conte J, 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 Sep 15;131(6):E851-61.

Rybarczyk P, Vanlaeys A, Brassart B, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Sevestre H, et al. The Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion through the Hsp90alpha/uPA/MMP2 pathway. *Neoplasia.* 2017 Apr;19(4):288-300.

Saarialho-Kere UK, Chang ES, Welgus HG, Parks WC. Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. *J Clin Invest.* 1992 Nov;90(5):1952-7.

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.

Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. *Biochem J.* 2007 Jan 15;401(2):505-13.

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.

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.

Santibanez JF, Obradovic H, Kukulj T, Krstic J. Transforming growth factor-beta, matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Dev Dyn.* 2018 Mar;247(3):382-95.

Sarkar AA, Zohn IE. Hctd1 regulates intracellular localization and secretion of Hsp90 to control cellular behavior of the cranial mesenchyme. *J Cell Biol.* 2012 Mar 19;196(6):789-800.

Schafer 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.

Schilling T, Miralles F, Eder C. TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages. *J Cell Sci.* 2014 Nov 1;127(Pt 21):4561-6.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7737-42.

Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, et al. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell.* 2003 Jul 25;114(2):191-200.

Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* 1988 Oct 1;48(19):5539-45.

Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, et al. An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell.* 2007 Jan 12;25(1):151-9.

Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 2003 May 8;194(1):1-11.

Sennoune SR, Bakunts K, Martinez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, et al. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1443-52.

Shapovalov G, Ritaine A, Skryma R, Prevarskaya N. Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis. *Semin Immunopathol.* 2016 May;38(3):357-69.

Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:200-6.

Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2014 Jan;9(1):1-20.

Siret C, Terciolo C, Dobric A, Habib MC, Germain S, Bonnier R, et al. Interplay between cadherins and alpha2beta1 integrin differentially regulates melanoma cell invasion. *Br J Cancer.* 2015 Nov 17;113(10):1445-53.

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol.* 2005 May;166(5):1541-54.

Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Jan;11(1):23-36.

Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28;281(30):20661-5.

Sobradillo D, Hernandez-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Nunez L, Villalobos C. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2014 Oct 17;289(42):28765-82.

Song C, Bae Y, Jun J, Lee H, Kim ND, Lee KB, et al. Identification of TG100-115 as a new and potent TRPM7 kinase inhibitor, which suppresses breast cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta.* 2017 Apr;1861(4):947-57.

Sporn MB. The war on cancer. *Lancet.* 1996 May 18;347(9012):1377-81.

Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jan;3(1):55-63.

Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol.* 1990 Apr;85(4):350-5.

Steinestel K, Eder S, Ehinger K, Schneider J, Genze F, Winkler E, et al. The small conductance calcium-activated potassium channel 3 (SK3) is a molecular target for Edelfosine to reduce the invasive potential of urothelial carcinoma cells. *Tumour Biol.* 2016 May;37(5):6275-83.

Stenbeck G, Horton MA. A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 9):1577-87.

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. *Mol Endocrinol*. 2000 Apr;14(4):545-53.

Stritt S, Nurden P, Favier R, Favier M, Ferioli S, Gotru SK, et al. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg(2+) homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat Commun*. 2016 Mar 29;7:11097.

Strumylaite L, Kregzdyte R, Bogusevicius A, Poskiene L, Baranauskiene D, Pranys D. Association between cadmium and breast cancer risk according to estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2: epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 May;145(1):225-32.

Su LT, Agapito MA, Li M, Simonson WT, Huttenlocher A, Habas R, et al. TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem*. 2006 Apr 21;281(16):11260-70.

Su LT, Chen HC, Gonzalez-Pagan O, Overton JD, Xie J, Yue L, et al. TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase. *J Mol Biol*. 2010 Mar 5;396(4):858-69.

Su LT, Liu W, Chen HC, Gonzalez-Pagan O, Habas R, Runnels LW. TRPM7 regulates polarized cell movements. *Biochem J*. 2011 Mar 15;434(3):513-21.

Suemizu H, Monnai M, Ohnishi Y, Ito M, Tamaoki N, Nakamura M. Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/SCID/gammacnull (NOG) mice. *Int J Oncol*. 2007 Oct;31(4):741-51.

Sun J, Lu F, He H, Shen J, Messina J, Mathew R, et al. STIM1- and Orai1-mediated Ca(2+) oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol*. 2014 Nov 24;207(4):535-48.

Sun Y, Schaar A, Sukumaran P, Dhasarathy A, Singh BB. TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells is mediated via TRPM7 expression. *Mol Carcinog*. 2018 Jun;57(6):752-61.

Sun Y, Selvaraj S, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB. Increase in serum Ca2+/Mg2+ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels. *J Biol Chem*. 2013 Jan 4;288(1):255-63.

Sun Y, Sukumaran P, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB. Cholesterol-induced activation of TRPM7 regulates cell proliferation, migration, and viability of human prostate cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1843(9):1839-50.

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.

Talmadge JE. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11471-5.

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.

Thurber AE, Nelson M, Frost CL, Levin M, Brackenbury WJ, Kaplan DL. IK channel activation increases tumor growth and induces differential behavioral responses in two breast epithelial cell lines. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42382-97.

Thuringer D, Chanteloup G, Winckler P, Garrido C. The vesicular transfer of CLIC1 from glioblastoma to microvascular endothelial cells requires TRPM7. *Oncotarget*. 2018 Sep 7;9(70):33302-11.

Tokar EJ, Benbrahim-Tallaa L, Waalkes MP. Metal ions in human cancer development. *Met Ions Life Sci*. 2011;8:375-401.

Tortora GJ, Derrickson B. *Manuel d'anatomie et de physiologie humaines: De Boeck supérieur*; 2017.

Trapani V, Arduini D, Cittadini A, Wolf FI. From magnesium to magnesium transporters in cancer: TRPM7, a novel signature in tumour development. *Magnes Res*. 2013 Oct-Dec;26(4):149-55.

Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1536-9.

Turner KL, Honasoge A, Robert SM, McFerrin MM, Sontheimer H. A proinvasive role for the Ca(2+) - activated K(+) channel KCa3.1 in malignant glioma. *Glia*. 2014 Jun;62(6):971-81.

Umehura M, Baljinnayam E, Feske S, De Lorenzo MS, Xie LH, Feng X, et al. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration. *PLoS One*. 2014;9(2):e89292.

Vahle AK, Domikowsky B, Schwoppe C, Krahling H, Mally S, Schafers M, et al. Extracellular matrix composition and interstitial pH modulate NHE1-mediated melanoma cell motility. *Int J Oncol*. 2014 Jan;44(1):78-90.

Van Maele-Fabry G, Lombaert N, Lison D. Dietary exposure to cadmium and risk of breast cancer in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int*. 2016 Jan;86:1-13.

van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*. 2011 Jul-Oct;728(1-2):23-34.

Venza M, Visalli M, Biondo C, Oteri R, Agliano F, Morabito S, et al. Epigenetic effects of cadmium in cancer: focus on melanoma. *Curr Genomics*. 2014 Dec;15(6):420-35.

Venza M, Visalli M, Biondo C, Oteri R, Agliano F, Morabito S, et al. Epigenetic marks responsible for cadmium-induced melanoma cell overgrowth. *Toxicol In Vitro*. 2015 Feb;29(1):242-50.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):607-20.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.

Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, et al. TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium*. 2013 Dec;54(6):404-15.

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.

Voellmy R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones*. 2004 Summer;9(2):122-33.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013 Oct 31;369(18):1691-703.

Walsh N, Larkin A, Swan N, Conlon K, Dowling P, McDermott R, et al. RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. *Cancer Lett*. 2011 Jul 28;306(2):180-9.

Wang J, Liao QJ, Zhang Y, Zhou H, Luo CH, Tang J, et al. TRPM7 is required for ovarian cancer cell growth, migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Nov 28;454(4):547-53.

Wang P, Zeng Y, Liu T, Zhang C, Yu PW, Hao YX, et al. Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 28;20(8):2071-8.

Wang S, Huang S, Sun YL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2646148.

Wang Y, Li SJ, Pan J, Che Y, Yin J, Zhao Q. Specific expression of the human voltage-gated proton channel Hv1 in highly metastatic breast cancer cells, promotes tumor progression and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 26;412(2):353-9.

Wang Y, Wu X, Li Q, Zhang S, Li SJ. Human voltage-gated proton channel hv1: a new potential biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e70550.

Wei X, Li J, Xie H, Wang H, Wang J, Zhang X, et al. Chloride intracellular channel 1 participates in migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting maspin. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jan;30(1):208-16.

Wei Z, Song X, Shaikh ZA. Cadmium promotes the proliferation of triple-negative breast cancer cells through EGFR-mediated cell cycle regulation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Nov 15;289(1):98-108.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10079-86.

Widmanier EP, Raff, Hershel., Strang, Kevin.T. *Physiologie humaine Les mécanismes du fonctionnement de l'organisme 4ème édition ed2004.*

Wolf FI, Fasanella S, Tedesco B, Torsello A, Sgambato A, Faraglia B, et al. Regulation of magnesium content during proliferation of mammary epithelial cells (HC-11). *Front Biosci.* 2004 Sep 1;9:2056-62.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013 Sep;63(5):318-48.

Wong CH, Mruk DD, Lui WY, Cheng CY. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. *J Cell Sci.* 2004 Feb 15;117(Pt 5):783-98.

Wong R, Turlova E, Feng ZP, Rutka JT, Sun HS. Activation of TRPM7 by naltriben enhances migration and invasion of glioblastoma cells. *Oncotarget.* 2017 Feb 14;8(7):11239-48.

Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Mar;38(3):226-56.

Wu Y, Liu Y, Pan Y, Lu C, Xu H, Wang X, et al. MicroRNA-135a inhibits cardiac fibrosis induced by isoproterenol via TRPM7 channel. *Biomed Pharmacother.* 2018 Aug;104:252-60.

Xia J, Huang N, Huang H, Sun L, Dong S, Su J, et al. Voltage-gated sodium channel Nav 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *Int J Cancer.* 2016 Dec 1;139(11):2553-69.

Xia J, Wang H, Huang H, Sun L, Dong S, Huang N, et al. Elevated Orai1 and STIM1 expressions upregulate MACC1 expression to promote tumor cell proliferation, metabolism, migration, and invasion in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 2016 Oct 10;381(1):31-40.

Xia J, Yu X, Tang L, Li G, He T. P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. *Oncol Rep.* 2015 Jul;34(1):103-10.

Xie R, Xu J, Xiao Y, Wu J, Wan H, Tang B, et al. Calcium Promotes Human Gastric Cancer via a Novel Coupling of Calcium-Sensing Receptor and TRPV4 Channel. *Cancer Res.* 2017 Dec 1;77(23):6499-512.

Xu H, Lai W, Zhang Y, Liu L, Luo X, Zeng Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer.* 2014 May 10;14:330.

Xu W, Mollapour M, Prodromou C, Wang S, Scroggins BT, Palchick Z, et al. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. *Mol Cell.* 2012 Aug 10;47(3):434-43.

Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene.* 2013 Nov 7;32(45):5253-60.

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.

Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol.* 2001 Feb 15;19(4):1118-27.

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):19-26.

Yan FF, Pratt EB, Chen PC, Wang F, Skach WR, David LL, et al. Role of Hsp90 in biogenesis of the beta-cell ATP-sensitive potassium channel complex. *Mol Biol Cell.* 2010 Jun 15;21(12):1945-54.

Yang CP, Zhang ZH, Zhang LH, Rui HC. Neuroprotective Role of MicroRNA-22 in a 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Model of Parkinson's Disease via Regulation of Its Target Gene TRPM7. *J Mol Neurosci.* 2016 Dec;60(4):445-52.

Yang LL, Liu BC, Lu XY, Yan Y, Zhai YJ, Bao Q, et al. Inhibition of TRPC6 reduces non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Oncotarget.* 2017 Jan 17;8(3):5123-34.

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):526-33.

Yang N, Tang Y, Wang F, Zhang H, Xu D, Shen Y, et al. Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett.* 2013 Apr 28;330(2):163-9.

Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*. 2009 Feb 3;15(2):124-34.

Yang Y, Rao R, Shen J, Tang Y, Fiskus W, Nechtman J, et al. Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90 α in tumor cell invasion. *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4833-42.

Yang YM, Jung HH, Lee SJ, Choi HJ, Kim MS, Shin DM. TRPM7 Is Essential for RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2013 Feb;17(1):65-71.

Yee NS, Kazi AA, Li Q, Yang Z, Berg A, Yee RK. Aberrant over-expression of TRPM7 ion channels in pancreatic cancer: required for cancer cell invasion and implicated in tumor growth and metastasis. *Biol Open*. 2015 Mar 13;4(4):507-14.

Yee NS, Zhou W, Lee M, Yee RK. Targeted silencing of TRPM7 ion channel induces replicative senescence and produces enhanced cytotoxicity with gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Lett*. 2012 May 1;318(1):99-105.

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. *Dis Model Mech*. 2011 Mar;4(2):240-54.

Yogi A, Callera GE, Tostes R, Touyz RM. Bradykinin regulates calpain and proinflammatory signaling through TRPM7-sensitive pathways in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Feb;296(2):R201-7.

Yu C, Wang Y, Peng J, Shen Q, Chen M, Tang W, et al. Mitochondrial calcium uniporter as a target of microRNA-340 and promoter of metastasis via enhancing the Warburg effect. *Oncotarget*. 2017 Oct 13;8(48):83831-44.

Yu H, Zhang Z, Lis A, Penner R, Fleig A. TRPM7 is regulated by halides through its kinase domain. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Aug;70(15):2757-71.

Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):35-48.

Yu Y, Hamza A, Zhang T, Gu M, Zou P, Newman B, et al. Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2010 Feb 15;79(4):542-51.

Zeng Z, Inoue K, Sun H, Leng T, Feng X, Zhu L, et al. TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):C308-18.

Zeng Z, Leng T, Feng X, Sun H, Inoue K, Zhu L, et al. Silencing TRPM7 in mouse cortical astrocytes impairs cell proliferation and migration via ERK and JNK signaling pathways. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119912.

Zhang J, Zhao F, Zhao Y, Wang J, Pei L, Sun N, et al. Hypoxia induces an increase in intracellular magnesium via transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels in rat hippocampal neurons in vitro. *J Biol Chem*. 2011 Jun 10;286(23):20194-207.

Zhang K, Mu L, Ding MC, Xu R, Ding ZJ, Liang J. NF κ B mediated elevation of KCNJ11 promotes tumor progression of hepatocellular carcinoma through interaction of lactate dehydrogenase A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):246-53.

Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 May 21;24(19):2047-60.

Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan CG, et al. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jan;7(1):162-70.

Zhang X, Zu H, Zhao D, Yang K, Tian S, Yu X, et al. Ion channel functional protein kinase TRPM7 regulates Mg ions to promote the osteoinduction of human osteoblast via PI3K pathway: In vitro simulation of the bone-repairing effect of Mg-based alloy implant. *Acta Biomater*. 2017 Nov;63:369-82.

Zhang Y, Zhou L, Zhang X, Bai J, Shi M, Zhao G. Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci*. 2012 Oct;33(5):1125-31.

Zhang Z, Yu H, Huang J, Faouzi M, Schmitz C, Penner R, et al. The TRPM6 kinase domain determines the Mg.ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. *J Biol Chem*. 2014 Feb 21;289(8):5217-27.

Zhao LY, Li J, Huang XQ, Wang GH, Lv XF, Meng WF, et al. Xylometazoline B exerts antihypertensive effect in renovascular hypertensive rats via the NO-sGC-cGMP pathway and calcium signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 May;39(5):875-84.

Zhao W, Lu M, Zhang Q. Chloride intracellular channel 1 regulates migration and invasion in gastric cancer by triggering the ROS-mediated p38 MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015 Dec;12(6):8041-7.

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.

Zhao Z, Zhang M, Duan X, Chen Y, Li E, Luo L, et al. TRPM7 Regulates AKT/FOXO1-Dependent Tumor Growth and Is an Independent Prognostic Indicator in Renal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2018 Jun;16(6):1013-23.

Zheng DL, Huang QL, Zhou F, Huang QJ, Lin JY, Lin X. PA28beta regulates cell invasion of gastric cancer via modulating the expression of chloride intracellular channel 1. *J Cell Biochem.* 2012 May;113(5):1537-46.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015 Nov 26;527(7579):525-30.

Zhou ZH, Song JW, Li W, Liu X, Cao L, Wan LM, et al. The acid-sensing ion channel, ASIC2, promotes invasion and metastasis of colorectal cancer under acidosis by activating the calcineurin/NFAT1 axis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Sep 19;36(1):130.

Zhu M, Chen L, Zhao P, Zhou H, Zhang C, Yu S, et al. Store-operated Ca²⁺ entry regulates glioma cell migration and invasion via modulation of Pyk2 phosphorylation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Nov 30;33:98.

Zhu Y, Men R, Wen M, Hu X, Liu X, Yang L. Blockage of TRPM7 channel induces hepatic stellate cell death through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Life Sci.* 2014 Jan 14;94(1):37-44.

Zierler S, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Porzgen P, Penner R, et al. 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.

Zubarik R, Gordon SR, Lidofsky SD, Anderson SR, Pipas JM, Badger G, et al. Screening for pancreatic cancer in a high-risk population with serum CA 19-9 and targeted EUS: a feasibility study. *Gastrointest Endosc.* 2011 Jul;74(1):87-95.

RESUME

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ACP) est le type de cancer le plus fréquent touchant le pancréas exocrine. Il est caractérisé par un phénotype métastatique et chimio-résistant pour lequel il n'existe aucun marqueur diagnostique, ni de traitement efficace. Ces caractéristiques expliquent son pronostic extrêmement sombre. Il présente un taux de survie à 5 ans ne dépassant pas 5 %. Les projections pour 2030 indiquent que ce cancer pourrait devenir la deuxième cause de mortalité. Il y a donc un besoin urgent de mieux comprendre comment progresse l'ACP.

La dissémination métastatique dépend de plusieurs mécanismes cellulaires dont l'invasion du stroma par les cellules cancéreuses. Nous avons montré récemment que le canal transmembranaire TRPM7 (*Transient Receptor Potential Melastatin-related 7*) est surexprimé dans l'ACP et régule la migration cellulaire. L'implication de TRPM7 dans l'invasion dans d'autres cancers est décrite. Le but de ce travail est d'évaluer le rôle de TRPM7 dans l'invasion et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans les cellules cancéreuses d'ACP et également dans les cellules non-cancéreuses pancréatiques.

TRPM7 régule l'invasion basale dans les cellules cancéreuses pancréatiques *via* l'entrée constitutive de magnésium et la régulation de la sécrétion de MMP-2, uPA et Hsp90 α . Plus précisément, TRPM7 interagit directement avec Hsp90 α et participe à la phosphorylation de ses résidus sérine. Le magnésium pourrait participer en activant la kinase de TRPM7 ou en modifiant la conformation de Hsp90 α . De plus, l'expression de TRPM7 dans les métastases est corrélée à celle dans la tumeur primaire.

Dans les cellules non-cancéreuses, TRPM7 n'est pas impliqué dans l'invasion basale mais sa surexpression (par transfection de plasmides ou induite par une exposition au cadmium, un polluant décrit comme probablement carcinogène) entraîne la transformation des cellules vers un phénotype invasif. TRPM7 est impliqué majoritairement dans les variations de l'homéostasie magnésique et dans la modification de la morphologie cellulaire ainsi que la transition vers un phénotype mésenchymateux.

Pour conclure, nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur le rôle de TRPM7 à la fois en tant que régulateur de l'invasion basale dans l'ACP et initiateur dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules épithéliales non-cancéreuses.

Mots clés : ACP, invasion, TRPM7, kinase, Hsp90 α , Magnésium, Cadmium

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer. It is characterized by a metastatic and chemoresistant phenotype for which there is no diagnostic marker or effective treatment. These characteristics explain its very poor prognosis. It has an overall 5-year survival rate less than 5%. It may become the second leading cause of cancer-related death by 2030. There is an urgent need to better understand PDAC progression.

Metastatic spread depends on several cellular mechanisms, including the invasion of stroma by cancer cells. We have recently shown that the transmembrane channel TRPM7 (Transient Receptor Potential Melastatin-related 7) is overexpressed in PDAC and regulates cell migration. The implication of TRPM7 in invasion in other cancers is described. The aim of this work is to evaluate TRPM7 implication in invasion and to highlight the molecular mechanisms in PDAC and non-cancer pancreatic cells.

TRPM7 channel regulates basal cell invasion, MMP-2, uPA and Hsp90 α secretion in human pancreatic cancer cell lines through constitutive Mg²⁺ entry. TRPM7 interacts directly with Hsp90 α and it contributes to the phosphorylation of serine residues. Magnesium could participate by activating TRPM7 kinase or by modifying Hsp90 α conformation. Moreover, TRPM7 expression in metastatic lymph nodes is correlated to its expression in primary tumor.

In non-cancer cells, TRPM7 is not implicated in basal cell invasion but its overexpression (through plasmid or chronic treatment with cadmium, known as probable carcinogen pollutant) induces invasive phenotype transition. TRPM7 is mainly involved in magnesium homeostasis variation, in cellular morphology modification and mesenchymal transition.

In conclusion, our results provide new insights into the key role of TRPM7 in both regulation of basal cell invasion in ACP and initiation of invasive phenotype acquisition in non-cancer epithelial cells.

Key words: PDAC, invasion, TRPM7, kinase, Hsp90 α , Magnesium, Cadmium