



**HAL**  
open science

# Rôle de la signalisation calcique dans la sensibilisation des cancers ovariens chimiorésistants aux stratégies anti-Bcl-xL

Marie-Laure Bonnefond

► **To cite this version:**

Marie-Laure Bonnefond. Rôle de la signalisation calcique dans la sensibilisation des cancers ovariens chimiorésistants aux stratégies anti-Bcl-xL. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC424 . tel-03908942

**HAL Id: tel-03908942**

**<https://theses.hal.science/tel-03908942>**

Submitted on 21 Dec 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

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

## Rôle de la signalisation calcique dans la sensibilisation des cancers ovariens chimiorésistants aux stratégies anti-Bcl-xL

Présentée et soutenue par  
**Marie-Laure BONNEFOND**

Thèse soutenue publiquement le 20 décembre 2017  
devant le jury composé de

Mme Halima OUADID-AHIDOUCH	Professeur des Universités, Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
Mme Sophie BARILLÉ-NION	Chargé de Recherche HDR INSERM, Université de Nantes	Rapporteur
Mme Nadine DELIOT	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur
Mr Stéphane ALLOUCHE	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Caen Normandie	Examineur
Mme Monique N'DIAYE	Maître de Conférences, Université de Caen Normandie	Examineur
Mr Pascal GAUDUCHON	Professeur des Universités émérite, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Pascal GAUDUCHON, Laboratoire INSERM U1086 « ANTICIPE »  
Unité de Recherche Interdisciplinaire pour la Prévention et le Traitement des Cancers  
Axe 2 : Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers de l'Ovaire (BioTICLA)





## Remerciements

### Mon jury de thèse

Tout d'abord je remercie le Professeur Halima Ouadid-Ahidouch et le Docteur Sophie Barillé-Nion d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir examiné avec attention ce manuscrit.

Je remercie le Docteur Nadine Déliot d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail.

Je remercie également le Professeur Stéphane Allouch d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, ainsi que de m'avoir accueillie dans le laboratoire de biochimie du CHU de Caen pour effectuer les mesures d'oxygraphie. Dans ce cadre, j'en profite pour remercier Pierre Ollitrault et Marie-Louise de m'avoir formée à cette technique et le personnel du laboratoire pour sa gentillesse.

### BioTICLA

Je remercie le Docteur Laurent Poulain de m'avoir accueillie au sein de son équipe ainsi que pour tous les conseils qu'il m'a donnés depuis maintenant cinq ans.

Je remercie le Professeur Pascal Gauduchon, mon directeur de thèse, d'avoir toujours veillé à l'avancement de mon projet avec bienveillance, en y apportant idées et innombrables ressources bibliographiques.

Je remercie particulièrement le Docteur Monique N'Diaye, mon encadrante de thèse, de m'avoir formée, de l'apprentissage des manip' en première année de master jusqu'à la rédaction de cette thèse. Merci pour ton encadrement scientifique et pour les collaborations que tu as mises en place et qui m'ont permis de découvrir de nouvelles techniques et d'élargir ma vision de la science. Je retiendrai qu'il ne faut jamais rien lâcher, et parfois, avoir un peu les « yeux de la foi » ! Je te souhaite beaucoup de réussites dans la suite de tes projets au laboratoire !

Merci à Bernard pour tous nos échanges scientifiques et moins scientifiques. Partager ton expérience de labo et de la vie a été très enrichissante et souvent très drôle aussi !

Je remercie Christophe de m'avoir initiée avec beaucoup de bienveillance à l'enseignement. Cette expérience a été pour moi très enrichissante et conforte l'idée d'en faire mon métier.

Merci à Marie, Emilie, Mélanie, Matthieu et Pierre-Emmanuel d'avoir toujours eu un œil bienveillant sur mon projet et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Merci à Florence, Edwige et Marie-Hélène de m'avoir formée, dans la bonne humeur, aux différentes techniques utilisées au laboratoire.

Merci aussi à Jérémie pour les bons moments passés autour d'un café.

Merci à Laëtitia d'avoir simplifié mes démarches administratives, notamment au moment de l'impression de ce travail.

Merci à Chantal, qui, en plus d'avoir un sourire contagieux, m'a permis de travailler dans un labo toujours parfaitement propre et où il ne manque jamais rien dans les placards.

Merci aux anciens thésards, Charlotte, Abdel, et Nico d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions et pour me donner des petits coups de pouce !

Merci à Romane, de m'avoir aidée dans les moments de rush ! Travailler avec toi a été un réel plaisir ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite et surtout de réaliser une très belle thèse !

Merci aux nouveaux thésards Anaïs et Pierre-Marie, vous apportez un regard extérieur au labo qui ne fait que l'enrichir ! Bon vent à tous les deux pour les prochaines années !

Un grand merci aux nouvelles troisièmes années, Mégane et Charlène. J'ai passé de très bons moments avec vous les filles ! Bon courage pour la dernière ligne droite, avec l'énergie que vous avez, ça ne devrait pas poser de problème !

Merci beaucoup à Cécile pour nos fous rires en labo, tes cours de cuisine et tous nos moments «blablas» interminables !

Je remercie très chaleureusement le «nouveau et talentueux Docteur Siham» et Louis-Bastien, vous avez été mes piliers pendant cette thèse, toujours là quand j'en avais besoin et aussi pour rire, se défouler et pour les pauses «café-carambar» ! Je garderai de très bons souvenirs de tous ces moments de complicité ! Siham, j'attends de pouvoir vulgariser tes nombreuses publis devant mes élèves ! ;)

## Les collaborations

Je remercie le Professeur Denis Vivien de m'avoir permis de réaliser les expériences de microspectrofluorimétrie au sein de son unité INSERM UMR-S1237 Physiologie et imagerie des troubles neurologiques (PhIND). Merci à Sophie Lenoir de ne pas avoir compté son temps pour m'aider à mettre au point les mesure des flux calciques, ainsi qu'à tous les gens que j'ai pu croiser à Cycéron, pour leur accueil et leur sympathie.

Merci à Nicolas Elie et à Didier Goux de m'avoir accueillie au CMABio et de m'avoir permis d'obtenir de si jolis résultats d'imagerie.

## Mes proches

Merci à la bande de copains de Haute-Normandie, Marie, Laure, Evelyne, Charlène, Kévin, Damien, François et qui s'allonge encore, pour votre soutien, nos délires et fous rires qui s'accumulent depuis une dizaine d'années maintenant ! C'est promis l'année prochaine je reviendrai plus souvent !

Merci à Clémence, Tony et Emma pour tous les bons moments passés à la fac, au ciné, en voyage, ou chez les uns et les autres en France et en Belgique !

Merci à tous les copains de Jouons Ensemble, Sophie, Tim, Renaud, Vincent et tous les autres, d'avoir sorti vos meilleures cartes pour me faire rire lors de nos nombreuses après-midis/soirées jeux !

Je remercie, Monique et Gilles, sur qui j'ai toujours pu compter depuis mon arrivée à Caen et chez qui j'ai pu passer de très bons moments, Médéric que j'ai eu plaisir à retrouver chez eux et Nadège pour nos dimanches-piscines, et autres sorties-papotages ! Merci aussi à Axelle, Ghislain et leurs trois loulous pour tous les moments passés ensemble. J'ai des heures de constructions de Legos à rattraper avec Théotime, j'essayerai de passer vous faire des coucous un peu plus régulièrement !

Je remercie beaucoup Nicolas, qui a toujours fait de son mieux pour embellir nos petites vies ! Merci aussi à sa famille pour les bons repas passés ensemble !

Enfin, je tiens à remercier particulièrement ma famille, Anne-Claire et Corentin, Cassandre et JB pour leur soutien et mes parents, pour avoir toujours été là pour moi. Je vous en suis tellement reconnaissante.

## Table des matières

Abréviations .....	7
Introduction générale.....	14
Etude bibliographique .....	16
I. Rappels sur la structure et les fonctions des ovaires .....	16
II. Le cancer de l'ovaire .....	17
1. Epidémiologie et principaux facteurs de risques .....	17
2. Une pathologie complexe .....	19
A. Classification des cancers de l'ovaire .....	19
B. Origines des cancers de l'ovaire.....	24
3. Symptômes et diagnostic .....	26
4. Les traitements de référence .....	27
5. Le problème de la chimiorésistance.....	33
6. Développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour pallier le manque d'efficacité de la chimiothérapie.....	36
A. Les anti-angiogéniques.....	38
B. Les inhibiteurs de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) .....	39
C. L'immunothérapie .....	42
D. Cibler les dérégulations de la famille Bcl-2 pour restaurer la mort cellulaire par apoptose	43
III. La modulation des flux calciques : une stratégie thérapeutique pertinente .....	75
1. Les acteurs de la signalisation calcique .....	76
A. Les canaux, pompes, échangeurs .....	76
B. Les récepteurs .....	91
C. Les molécules activées par le calcium .....	95
2. Le calcium, un second messenger versatile mais au signal spécifique .....	100
3. Calcium et contrôle de l'apoptose .....	104
4. Calcium et autophagie.....	108
5. Calcium et métabolisme énergétique .....	113
6. Calcium et cancérogenèse.....	116
A. Remodelage de l'expression et de l'activité des canaux calciques dans les cancers.....	116
B. Remodelage de l'expression des molécules effectrices du calcium dans les cancers .....	120
C. Impact des flux calciques dans les grands processus cellulaires impliqués dans la cancérogenèse.....	120
7. Cibler le calcium, une stratégie pertinente ? .....	128
8. Le carboxyamidotriazole (CAI).....	132

Contexte et objectifs de la thèse.....	141
Résultats.....	143
Publication n°1 : .....	144
L'inhibition des signaux calciques sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes aux stratégies anti-Bcl-x <sub>L</sub> <i>via</i> l'inhibition de Mcl-1.....	144
Publication n°2 : .....	146
L'inhibition des canaux calciques capacitifs par le carboxyamidotriazole sensibilise les cellules ovariennes chimiorésistantes aux stratégies anti-Bcl-x <sub>L</sub> en inhibant de Mcl-1.....	146
Partie 3 : le carboxyamidotriazole induit un nouveau type de mort : l'autosis.....	152
Discussion générale.....	180
Conclusion générale et perspectives.....	190
Bibliographie.....	192

## Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil reproducteur féminin ( <a href="http://ovariancancerday.org">http://ovariancancerday.org</a> ).....	16
Figure 2 : Coupe d'un ovaire et cycle ovarien ( <a href="http://www.arcagy.org">http://www.arcagy.org</a> ). ....	16
Figure 3 : Incidence et mortalité projetées en 2015 des principaux cancers (HCL/Francim/Invs/INCa) .....	18
Figure 4 : Modèles de développement de carcinome séreux de bas et haut grade. (Kurman and Shih, 2010).....	25
Figure 5 : Modèle de développement de carcinomes endométrioides de bas grade et à cellules claires. (Kurman and Shih, 2010).....	25
Figure 6 : Impact du résidu post-résection chirurgicale des tumeurs ovariennes sur la survie globale (du Bois et al., 2009).....	27
Figure 7 : Score de Sugarbaker. (Padmanabhan et al., 2015) .....	28
Figure 8 : Structures chimiques du cisplatine et du carboplatine.....	29
Figure 9 : Structure chimique du Paclitaxel.....	30
Figure 10 : Processus de l'angiogenèse et mécanisme d'action du bévacicumab.....	31
Figure 11: Mécanismes moléculaires de la résistance au cisplatine (Galluzzi et al., 2014). ....	34
Figure 12 : Mécanismes moléculaires de la résistance aux taxols (Kavallaris, 2010). ....	36
Figure 13 : Thérapies ciblant les caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). ....	37
Figure 14 : Caractéristiques tumorales et exemple de médicaments approuvés ou en évaluation dans les cancers de l'ovaire (Petrillo et al., 2016). ....	38
Figure 15 : Rôle des inhibiteurs de PARP dans la létalité synthétique (Sonnenblick et al., 2015). ....	40
Figure 16 : Survie sans progression des patientes traitées avec le Niraparib <i>versus</i> placebo (Mirza et al., 2016).....	41
Figure 17 : PD-1 et cancer. (Sznol and Chen, 2013) .....	42
Figure 18 : Les trois voies majeures de la mort cellulaire. (Nunes et al., 2014).....	44
Figure 19 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. (Beesoo et al., 2014) .....	46
Figure 20 : Mécanisme d'activation de CAD (Samejima and Earnshaw, 2005).....	46
Figure 21 : Structure de Bcl-x <sub>L</sub> . (Birkinshaw and Czabotar, 2017).....	47
Figure 22 : Changements conformationnels et formation du pore par les protéines pro-apoptotiques multidomaines. (Birkinshaw and Czabotar, 2017) .....	48
Figure 23 : Structures/fonctions des protéines de la famille Bcl-2. (Moldoveanu et al., 2014) .....	49
Figure 24 : Mcl-1 joue deux rôles principaux au sein du mécanisme d'apoptose cellulaire (Akgul, 2009).....	52
Figure 25 : Représentation schématique de la protéine Mcl-1 montrant les régions fonctionnelles et les sites de modification post-traductionnelles. (Mojsa et al., 2014) .....	53
Figure 26 : Principaux modes de régulation de Mcl-1. (D'après Akgul, 2009) .....	55
Figure 27 : Fixation d'BH3 mimétique sur un anti-apoptotique (Ashkenazi et al., 2017).....	57
Figure 28 Structures chimiques de BH3 mimétiques pan-inhibiteurs.....	57
Figure 29 : Structure du Navitoclax lié à Bcl-x <sub>L</sub> (Ashkenazi et al., 2017).....	58
Figure 30 : Structures chimiques de BH3 mimétiques ciblant spécifiquement Mcl-1 .....	60
Figure 31 : Composants clés des quatre voies majeures des MAPK. (Berwick and Harvey, 2011).....	63
Figure 32 : Schéma Représentation schématique de la voie MAPK et de deux de ses inhibiteurs. (adapté de Uehling and Harris, 2015) .....	63
Figure 33 : Schéma simplifié de la voie PI3K/Akt/mTOR. (Holmes, 2011) .....	65
Figure 34 : Les trois classes de PI3K (Vanhaesebroeck et al., 2012) .....	66
Figure 35 : Représentation schématiques des différentes isoformes d'Akt. (adapté d'Osorio-Fuentealba et al., 2015).....	67
Figure 36 : Akt, une kinase impliquée dans les grands processus cellulaires (vivanco et al., 2002).....	67



Figure 37 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2. (Laplante et Sabatini 2012) .....	68
Figure 38 : Activation de mTORC1 et mTORC2 et implication dans les grands mécanismes cellulaires. (Laplante et Sabatini 2012) .....	69
Figure 39 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. (adapté de (Mabuchi et al., 2015) .....	70
Figure 40 : Incidence des altérations génétiques de la voie PI3K/Akt/mTOR (Mabuchi et al., 2015) ..	71
Figure 41 : Représentation schématique de la voie PI3K/Akt/mTOR et de ses différentes classes d'inhibiteurs pharmacologiques.....	74
Figure 42 : Structure du VDAC. (Ujwal et al., 2008) .....	76
Figure 43 : Le PTP mitochondrial. (Nageswara et al., 2007).....	77
Figure 44 : Structure du canal MCU. (Mammucari et al., 2016) .....	78
Figure 45 : Régulation de l'IP3R. (Berridge, 2012) .....	79
Figure 46 : Régulation de RYR2. (Berridge, 2012) .....	80
Figure 47 : Structure cristallisée d'une pompe SERCA dans son état lié à l'ADP et au calcium.....	81
Figure 48 : Structure et activation des PMCA (Lopreiato et al., 2014).....	82
Figure 49 : Schéma du NCX au sein de la cellule. (Wang et al., 2002) .....	83
Figure 50 : Structure des VOCC (Berridge, 2012) .....	84
Figure 51 : Mécanisme d'activation des VOCC (Berridge, 2012).....	84
Figure 52 : Activation de RYR1 par interaction physique avec un canal calcique voltage-dépendant activé. (Lanner, 2012).....	85
Figure 53 : Activation de RYR2 <i>via</i> l'activation d'un canal calcique voltage-dépendant. (Lanner, 2012) .....	85
Figure 54 : Arbre phylogénétique de la famille des canaux TRP (Berridge, 2012).....	86
Figure 55 : Schéma de la structure des canaux TRPV5 (Hoenderop and Bindels, 2008). .....	87
Figure 56 : Représentation schématique de STIM1 humain (A) et de l'interaction de STIM1 avec les canaux perméables au calcium Orai1 et TRPC1 (B et C). (Jardin and Rosado, 2016).....	89
Figure 57 : Activation des SOC (Chen et al., 2013). .....	90
Figure 58 : Modèle proposé pour l'activation de TRPC1. (Ambudkar et al., 2017).....	91
Figure 59 : Le récepteur couplé aux protéines G. (Dorsam and Gutkind, 2007).....	92
Figure 60 : Exemple de RTK (Fantauzzo and Soriano, 2015) .....	93
Figure 61 : Activation de la PLC par le RTK (Schlessinger, 2000).....	93
Figure 62 : Structure des six familles de PLC. (Cockcroft, 2006) .....	94
Figure 63 : Mode d'activation des différentes familles de PLC (Gresset et al., 2012) .....	94
Figure 64 : Le calcium toolkit (Monteith et al., 2017) .....	95
Figure 65 : Représentation schématique du motif liant le calcium EF-hand. (Beaudeau et al., 1999) .	95
Figure 66 : Activation de la calmoduline par le calcium. (Slavov et al., 2013) .....	96
Figure 67 : Activation des CamKK et des CamKI et IV. (Berridge, 2012) .....	97
Figure 68 : Structure et activation de la CamKII. (Swulius and Waxham, 2008) .....	99
Figure 69 : Structure des PKC. (Cosentino-Gomes et al., 2012) .....	99
Figure 70 : Activation des cPKC. (Steinberg, 2012) .....	100
Figure 71 : Organisation spatiale du relargage de calcium des compartiments intracellulaires. (Berridge et al., 2000).....	101
Figure 72 : Les signaux calciques brefs et localisés entraînent la direction de la migration de la cellule. (Wei et al., 2009) .....	102
Figure 73 : Différence de réponses d'un lymphocyte B à la stimulation du même récepteur par un antigène. (Berridge, 1997).....	103
Figure 74 : Diversité du signal calcique. (Monteith et al., 2017).....	104

Figure 75 : Vue d'ensemble de la régulation du calcium intracellulaire par les protéines de la famille Bcl-2 dans les processus de mort cellulaire et de survie. (Vervliet et al., 2016) .....	105
Figure 76 : Progression de l'apoptose par différents mécanismes régulés par le calcium (Guo et al., 2009).....	107
Figure 77 : Schéma du processus autophagique. (Cicchini et al., 2015) .....	109
Figure 78 : L'inhibition de mTORC1 permet d'induire l'autophagie. (Jung et al., 2010).....	109
Figure 79 : Le calcium induit l'AMPK <i>via</i> la CamKK2, ce qui permet l'inhibition de mTOR et l'induction de l'autophagie. (Filippi-Chiela et al., 2016).....	110
Figure 80 : Illustration de plusieurs possibilités proposées pour lesquelles le calcium est capable de réguler l'induction et la progression de l'autophagie. ....	112
Figure 81 : Schéma de la glycolyse. (Berg et al., 2002) .....	113
Figure 82 : Schéma du cycle de krebs. (Kalyanaraman et al., 2017) .....	114
Figure 83 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Kalyanaraman et al., 2017) .....	115
Figure 84 : Implication des flux calciques dans la mise en place des « hallmarks » du cancer .....	122
Figure 85 : Modèle d'activation de mTORC1 par les acides aminés faisant intervenir la CaM et hVps34. (Gulati et al., 2008).....	125
Figure 86 : Implication du calcium dans la modulation des voies de signalisation.....	127
Figure 87 : Cibler spécifiquement une pompe calcique exprimée de façon aberrante. (Monteith et al., 2007).....	128
Figure 88 : Structure chimique du CAI et du CTO.....	133
Figure 89 : Evolution du cancer en fonction de l'administration de médicaments cytotoxiques, cytostatiques ou d'un traitement séquentiel mettant en jeu ces deux catégories de médicaments. (Kohn et al., 1995) .....	184
Figure 90 : Effets intégrés du CAI observés dans notre étude. ....	191

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification FIGO des stades des cancers de l’ovaire, des trompes de Fallope et du péritoine (Mutch and Prat, 2014).....	20
Tableau 2 : Classification des carcinomes ovariens en cinq groupes histologiquement distincts (Prat et al., 2015).....	21
Tableau 3 : Classification anatomo-clinique binaire de Shih et Kurman (Kurman and Shih, 2016).....	22
Tableau 4 : Caractéristiques de petites molécules qui ciblent les membres de la famille Bcl-2 (Ashkenazi et al., 2017). .....	60
Tableau 5 : Inhibiteurs pharmacologiques et localisation des VOCC (Weiss and De Waard, 2006).....	86
Tableau 6 : Identification des propriétés des sous-unités des canaux TRP. (Clapham, 2003).....	88
Tableau 7 : Altération de l’expression des canaux/transporteurs/pompes dans les cancers. (Cui et al., 2017).....	117
Tableau 8 : Synthèse de composés ciblant les canaux calciques/transporteurs/pompes. (Cui et al., 2017).....	129
Tableau 9 : Composés modulateurs des flux calciques ayant fait l’objet d’essais cliniques (Prevarskaya et al., 2013 ; Cui et al., 2017 ; Tian et al., 2012 ; Lu et al., 2012 recherche effectuée sur <a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a> en octobre 2017).....	131
Tableau 10 : Essais cliniques du carboxyamidotriazole et du carboxyamidotriazole orotate (CTO) ( <a href="https://clinicaltrials.gov">https://clinicaltrials.gov</a> en octobre 2017).....	139

# Abréviations

---

2-APB : 2-Aminoethoxydiphenyl borate

3-MA : 3-méthyl-adénine

4EBP1 : eIF4E Binding Protein 1

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AIF : Apoptosis Inducing Factor

Akt/PKB : Protéine Kinase B

AMBRA : Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy

AM-FM : amplitude modulation-fréquence modulation

AMP : adénosine monophosphate

ANT : transporteur des nucléotides adényliques

AP-1 : Activator Protein 1

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

APC : Anaphase Promoting Complex

aPKC : PKC atypiques qui regroupent les isoformes  $\zeta$  et  $\iota/\lambda$

apo-CaM : apo-calmoduline

ARCAGY-GYNECO : Association de Recherche sur les Cancers dont Gynécologiques - Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Étude des Cancers Ovariens et du sein

ARN : Acide RiboNucléique

asTORIS : active-site mTOR inhibitors

AT7B : ATPase, Cu<sup>2+</sup> transporting  $\beta$  polypeptide

ATG : autophagy-related genes

ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate

ATP11B : ATPase de classe IV, type B

Bad : Bcl-2 antagonist of cell death

BAFF : B-cell activating factor of the TNF family

Bak : Bcl-2 antagonist killer

BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

BAPTA-AM : 1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid tetra (AcetoxyMethyl) ester

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma 2  
Beclin-1 : marqueur déterminant de l'autophagie  
Bcl-w : Bcl-2-like 2  
Bcl-x<sub>L</sub> : B cell lymphoma X long isoform  
BCR : B-cell receptor  
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BER : réparation par excision de base  
BH : Bcl-2 Homology domain  
Bid : BH3 interacting domain death agonist  
Bik : Bcl-2-interacting killer  
Bim : Bcl-2 like 11  
BRCA1 : BReast CAncer 1  
BRCA2 : BReast CAncer 2  
BRITROC : British Translational Research Ovarian Cancer collaborative  
CA-125 : Cancer Antigen 125  
CAD : Caspase-Activated DNase  
CAI : Carboxyamidotriazole  
CaM : calmoduline  
CaMK : Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependant protein kinases  
CaMKK : Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin dependant protein kinases kinases  
Caspase : CysteinyI-aspartate-cleaving protease  
CERMN : Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie  
CHIP : chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale  
CHIPOR : Hyperthermic Intra-Peritoneal Chemotherapy in Relapse Ovarian Cancer Treatment  
CICR : Calcium-Induced Calcium-Release  
cPKC : PKC conventionnelles regroupant les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$   
CQ : chloroquine  
CRAC : calcium release-activated channels  
CRE : c-AMP response element  
CREB : c-AMP response element binding protein  
CTNNB1 : Catenin Beta 1  
CTO : Carboxyamidotriazole Orotate  
CTR1 : copper transporter 1

Da : Daltons

DAG : Diacylglycérol

DAPK : Death Associated Protein Kinase).

deptor : DEP domain-containing mTOR-interacting protein

Diablo : Direct IAP binding protein and low pI

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGTA : ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

eIF4E : eukaryotic translation Initiation Factor 4E

Elk-1 : ETS domain containing 1

EMRE : Essential MCU Regulator

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ESO : épithélium de surface ovarien

Fas-L : Fas-Ligand

FDA : Food and Drug Administration

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

FKBP12 : FK506-binding protein 12

FLIP : FLICE (FADD-Like IL-1 $\beta$ -Converting Enzyme)-Inhibitory Protein

FOXO3a : Forkhead box O3

GSC: Glioblastoma Stem-like Cells

GTPase Ras : Rat Sarcoma

HDAC4 : histone déacétylase 4

HER2 : Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIF-1 : Hypoxia-Inductible Factor-1

HIV : Human Immunodeficiency Virus

hMSH6 : human MutS protein homolog 6

HUVEC : human umbilical vein endothelial cells

IAP : Inhibitory Apoptosis Protein

IL-8 : interleukine 8

IP3R/InsP3R : Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor

IP3 : inositol triphosphate

IRBIT : IP3R-binding protein Released with Inositol Triphosphate

IRS1 : Insulin Receptor Substrat 1

JAK : Janus Kinase

JNK : c-Jun NH2-terminal protein Kinase

LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, également appelée ATG8

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1

MCU : Mitochondrial Uniporteur Channel

miARN : micro ARN

MLH1 : MutL homolog 1

mLST8 : mammalian lethal with SEC13 protein 8

MRP2 : multidrug associated protein 2

MSH2 : MutS protein homolog 2

mSin1 : mammalian Stress-activated map kinase-interacting protein 1

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

mTORC2 : : mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

Mule : Mcl-1 ubiquitin ligase E3

NAFT1 : Nuclear Factor of Activated T cells 1

NCX : échangeur sodium-calcium

NER : réparation par excision de nucleotide

NFκB : Nuclear Factor-κB

Noxa : NADPH oxydase activator

nPKC : nouvelles PKC comprenant les isoformes δ,ε, η, et θ

OAS : oligonucléotides anti-sens

Orai : calcium release-activated calcium channel protein

p70S6K/S6K1 : S6 Kinase 1 protein

PADRE : pan-DR epitope

PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymerase

PCI : Peritoneal Cancer Index

PD-1 : Programmed cell Death 1

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDGFR-β : β-type platelet-derived growth factor receptor

PKD1 : 3-phosphoinoside-dependant kinase 1  
PDL-1 : Programmed death-ligand 1  
PH : pleckstrin homology  
piARN : Piwi interacting ARN  
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase  
PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate  
PIP2 : phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate  
PIP3 : phosphatidylinositol 3-4-5 trisphosphate  
PKC : protéine kinase C  
PLC : phospholipases C  
PLK3 : Polo-like kinase 3  
PMCA : plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase  
PP1 : protein phosphatase 1  
PP2A : protein phosphatase 2A  
protor1/2 : protein observed with rictor 1 and 2  
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
PTP : Permeability Transition Pore  
Puma : p53 up-régulated modulator of apoptosis  
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma  
Raptor : Regulatory-associated protein of mTOR  
Ras : Rat Sarcoma  
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G  
RCPG AT1 : Angiotensin II receptor, type 1  
RE : Réticulum Endoplasmique  
Rheb : Ras homolog enriched in brain  
rhGM-CSF : recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor  
Rictor : Rapamcin-insensitive companion mTOR  
ROS : Reactive Oxygen Species  
rpS6 : ribosomal protein S6  
RSK : 90 KDa Ribosomal S6 Kinase  
RTK : récepteur à tyrosine kinase  
RYR : récepteurs à la ryanodine  
S6K1/P70S6K : S6 kinase-1



SAM : sterile-alpha motif  
SCF : Skp1-Cullin1-F-Box  
SERCA : Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SGK1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1  
SH2 : SRC homology 2  
shARN : short hairpin ARN  
SHP-2 : Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2  
siARN : small interfering ARN  
SK3 : small conductance calcium-activated potassium channel 3  
Smac : Second mitochondria-derived activator of caspase  
SOAR : région d'activation STIM1-Orai1  
SOC : Store-Operated Channel  
SOCE : Store-Operated Calcium Entry  
SQSTM1 : sequestosome 1  
SRF : serum response factor  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
STIC : carcinome séreux tubaire intraépithelial non invasif  
STIM : stromal interaction molecule  
tBid : truncated BH3 interacting domain death agonist  
TM : transmembranaire  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TRAIL : TNF Related apoptosis-inducing ligand  
Trim 17 : Tripartite motif contaning 17  
TRP : Transient Receptor Potential  
TRPA : TRP ankyrine  
TRPC : TRP canonique  
TRPM :TRP melastatine  
TRPML :TRP mucolipine  
TRPN :TRP No mechanoreceptor potential C  
TRPP :TRP polycystine  
TRPV :TRP vanilloide  
TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2

UFRAG : Ultraviolet irradiation resistance-associated gene

USP9X : Ubiquitin specific Peptidase 9X-linked

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channels

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Growth Factor Receptor

VOCC : Voltage-Operated Calcium Channel

VPS34 : vacuolar protein sorting 34

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis

# Introduction générale

---

Les cancers de l'ovaire représentent environ 4500 nouveaux cas par an et 3200 décès, ce qui en fait la première cause de décès par cancer gynécologique. Parmi ces cancers 90% correspondent au sous-type histologique séreux de haut grade et sont particulièrement agressifs. La thérapie de référence repose sur une chirurgie d'exérèse de la tumeur ainsi que sur l'administration de chimiothérapie à base de carboplatine et de paclitaxel, avec selon les cas ajout de Bévacicumab et d'Olaparib. Dans un premier temps une réponse au traitement est observée mais celle-ci est suivie par une rechute associée à une chimiorésistance. En l'absence de traitements alternatifs efficaces, cette chimiorésistance conduit au décès des patientes. Il y a donc une nécessité à développer des thérapies innovantes pour pallier ce manque d'efficacité des traitements. Dans ce cadre, notre équipe s'attache à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre cette chimiorésistance. Le laboratoire a ainsi montré que la chimiorésistance des cellules était liée à une dérégulation des protéines impliquées dans le processus de mort par apoptose. En effet, notre équipe a montré que deux molécules anti-apoptotiques : Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 étaient surexprimées dans les cancers de l'ovaire et coopéraient pour inhiber l'apoptose. L'inhibition de ces cibles est alors une stratégie pertinente pour restaurer la mort cellulaire. Un inhibiteur pharmacologique de Bcl-x<sub>L</sub>, l'ABT-737 est en essais cliniques dans les cancers de l'ovaire mais aucune molécule n'est disponible à ce jour pour inhiber Mcl-1. Par ailleurs, notre équipe a démontré la pertinence d'inhiber les voies de synthèse de Mcl-1, en particulier la voie de signalisation Akt/mTOR dans les cancers de l'ovaire. Or la littérature met en évidence que le calcium est capable de moduler l'expression de Mcl-1 et cette voie de signalisation.

Dans ce cadre, mon projet de thèse au sein de l'axe 2 de l'unité Anticipe, BioTICLA (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers de l'ovaire), visait à mettre en évidence que l'inhibition du calcium permettait d'inhiber Mcl-1 dans nos lignées cellulaires cancéreuses ovariennes puis de combiner les inhibiteurs des flux calciques utilisés à des stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> telles que l'ABT-737, afin d'induire l'apoptose.

Ce manuscrit de thèse aborde dans un premier temps le cancer de l'ovaire, la problématique de l'échec des traitements conventionnels et les stratégies de traitement émergentes. Dans un second temps il présente les acteurs de la signalisation calcique, leur rôle dans la cancérogenèse et dans la régulation des voies de signalisation qui contrôlent Mcl-1, en particulier PI3K/Akt/mTOR.

Les résultats, présentés sous forme d'articles, mettent ensuite en évidence la pertinence d'inhiber Mcl-1 grâce à la modulation des flux calciques, d'abord par l'utilisation d'un chélateur calcique

(Bonfond et al., 2015), puis grâce à l'utilisation d'une molécule pharmacologique : le Carboxyamidotriazole (CAI) (article soumis à Oncotarget). Nous avons ensuite pu montrer que ces molécules étaient capables de sensibiliser les cellules à des stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> dans nos lignées de cellules cancéreuses chimiorésistantes. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que le CAI induisait un type de mort particulier, précédé d'un changement morphologique important et avons tenté d'identifier ce type de mort cellulaire. Ces derniers travaux ne sont pas encore publiés.

Ces résultats sont suivis d'une discussion générale et d'une conclusion auxquelles sont associées les perspectives de ce projet. Enfin, les références bibliographiques clôturent ce manuscrit.

# Etude bibliographique

## I. Rappels sur la structure et les fonctions des ovaires

Les ovaires sont les organes reproducteurs féminins. Ils sont au nombre de deux et se situent au niveau de l'abdomen, dans la cavité pelvienne. Ils sont en forme d'amande, pèsent 6 à 8 grammes chez la femme adulte et mesurent 4 cm de long et 1,5 cm d'épaisseur. Ils forment avec les trompes de Fallope, l'utérus et le vagin, l'appareil reproducteur féminin. (Figure 1)

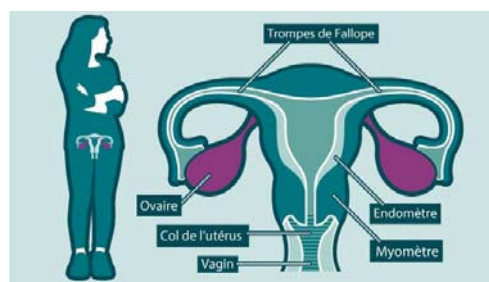


Figure 1 : Anatomie de l'appareil reproducteur féminin (<http://ovariancancerday.org>).

Au niveau histologique, ils sont recouverts par un épithélium cubique simple, l'épithélium de surface ovarien (ESO), et sont composés de deux zones différentes : la zone corticale, à la périphérie, qui est le lieu de maturation des ovocytes et la zone médullaire, au niveau interne, qui contient les vaisseaux sanguins. (Figure 2)

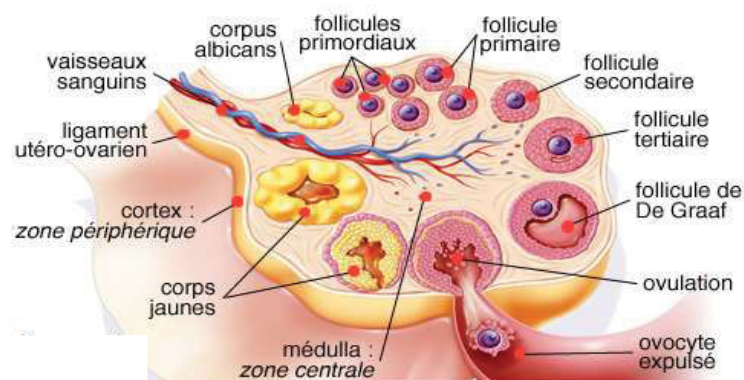


Figure 2 : Coupe d'un ovaire et cycle ovarien (<http://www.arcagy.org>).

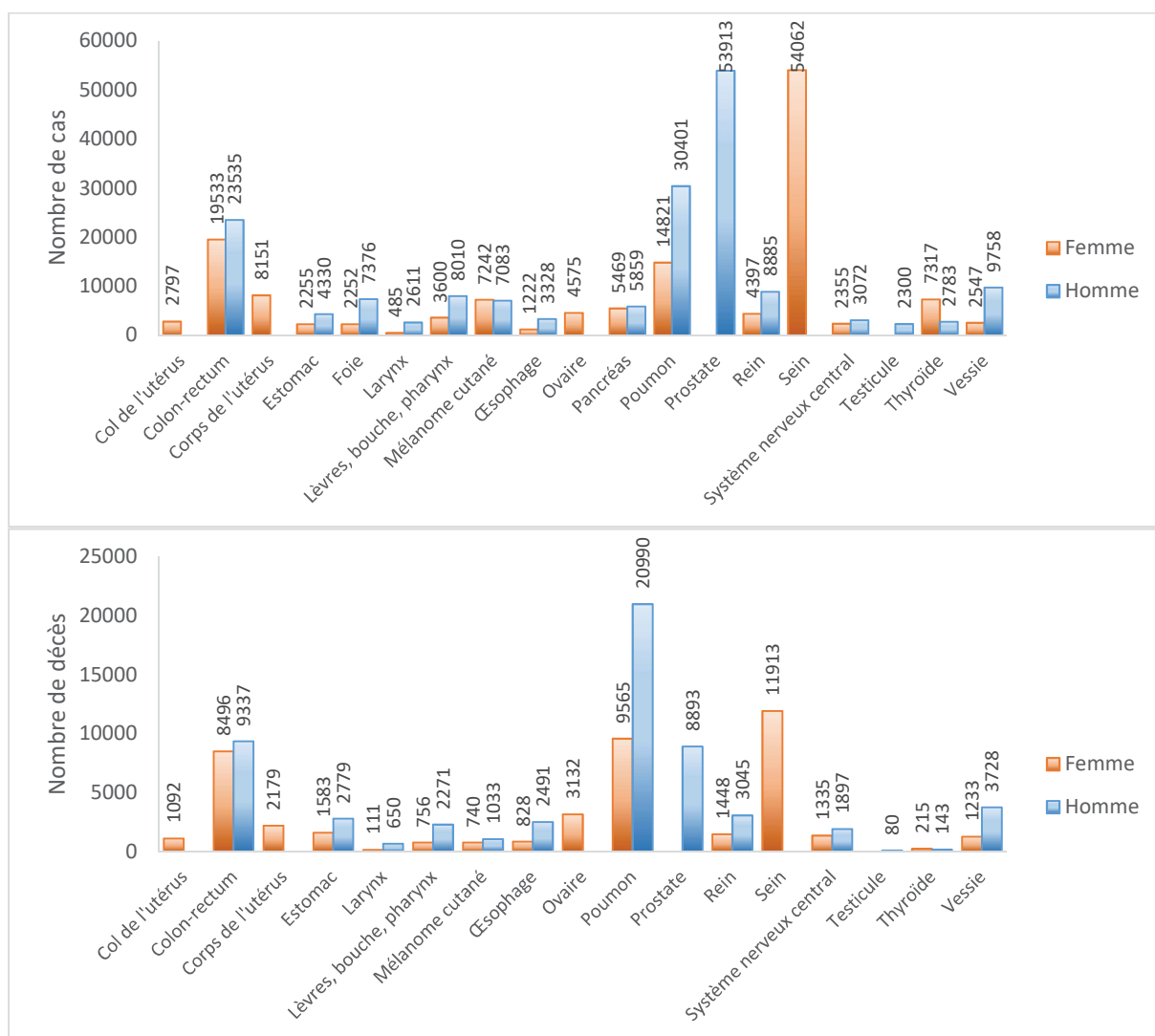
Ces organes sont également le lieu de synthèse des hormones sexuelles que sont les œstrogènes et la progestérone, par le follicule en évolution puis par le corps jaune (poche ayant expulsé l'ovocyte).

Ces hormones sont responsables de la mise en place et du maintien des caractères sexuels féminins et leur production est régie par les sécrétions hormonales de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

## II. Le cancer de l'ovaire

### 1. Epidémiologie et principaux facteurs de risques

Avec une incidence projetée de 4575 nouveaux cas en France pour 2015, les cancers de l'ovaire sont des cancers relativement rares en comparaison avec les 173560 cancers (toutes localisations confondues) dépistés chez la femme cette même année. Cependant, le nombre de décès projeté, de 3132 femmes, les rend particulièrement préoccupants (Figure 3). Les cancers de l'ovaire représentent en effet, la quatrième cause de décès par cancer chez la femme, derrière les cancers du sein, du poumon et du colon/rectum et la première cause de décès par cancer gynécologique. Le taux de survie à 5 ans n'est que de 43% tous stades de détections confondus (HCL/Francim/Invs/INCa). Ce sombre pronostic est principalement dû à l'absence de symptômes caractéristiques qui conduisent alors à un diagnostic tardif. En effet près de 75% de ces cancers sont diagnostiqués à un stade de dissémination avancée. Par ailleurs, l'âge moyen de dépistage des patientes, d'environ 65 ans, rend la prise en charge thérapeutique plus complexe du fait d'une plus grande fragilité des patientes et de leurs pathologies associées, nécessitant alors une prise en charge pluridisciplinaire.



**Figure 3 : Incidence et mortalité projetées en 2015 des principaux cancers (HCL/Francim/Invs/INCa)**

Les facteurs de risque sont multiples et encore assez mal caractérisés, néanmoins, l'âge constituerait un facteur de risque important. En effet, le National Cancer Institute a publié une étude démontrant que l'incidence des cancers de l'ovaire est plus de cinq fois supérieure pour les femmes dépassant l'âge de 65 ans. (Howlander et al., 2017)

L'hérédité, a également un rôle dans la survenue de certains cancers de l'ovaire. En effet, des mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans certains mécanismes de réparation de l'ADN, sont identifiées comme facteur de risque. Par exemple, les mutations des gènes BRCA1 (BReast CAncer 1) et BRCA2 (BReast CAncer 2), impliqués dans la réparation des cassures double-brins de l'ADN (détaillée dans la sous partie concernant les inhibiteurs de PARP), augmentent respectivement de 45% et de 11% ce risque. (Antoniou et al., 2003)

D'autres mutations localisées au niveau du gène TP53, associé au syndrome de Li Fraumeni, (prédisposition génétique ayant pour conséquence la survenue précoce de tumeurs diverses) ou au

niveau des gènes MLH1 (MutL homolog 1), MSH2 (MutS protein homolog 2) ou hMSH6 human MutS protein homolog 6), associées au syndrome de Lynch (prédisposition génétique à développer un cancer colorectal) augmentent également le risque de développer un cancer de l'ovaire. La protéine TP53, appelée «la gardienne du génome», est impliquée dans la réponse à une variété de stress cellulaires, dont les dommages de l'ADN. Son accumulation et son activation consécutive à un stress peuvent engendrer l'arrêt du cycle cellulaire, facilitant ainsi la mise en place de systèmes de réparation de l'ADN, le déclenchement du processus de mort par apoptose, ou encore la sénescence cellulaire. Les trois autres gènes codent pour des protéines impliquées dans le mécanisme de réparation des mésappariements de bases. (Karlan et al., 2016)

Par ailleurs, la théorie de l'ovulation incessante met en évidence que tous les facteurs favorisant l'activité ovarienne sont également des facteurs de risque et au contraire que ceux qui réduisent cette activité sont protecteurs. Ainsi la nulliparité, le nombre élevé de cycles ovulatoires au cours de la vie ou la mise en place d'un traitement hormonal de substitution sont des facteurs de risque, alors que l'utilisation d'une contraception orale et l'allaitement sont des facteurs protecteurs. (Fathalla, 2013)

## 2. Une pathologie complexe

### A. Classification des cancers de l'ovaire

Les cancers de l'ovaire se présentent sous la forme d'une tumeur primaire à laquelle peuvent être associées des métastases péritonéales ainsi que des métastases à distance. Par ailleurs, la sécrétion d'ascite, liquide dans lequel baignent des cellules inflammatoires et des cellules cancéreuses est souvent observée dans l'abdomen et facilite alors la dissémination tumorale.

Au niveau clinique, les cancers de l'ovaire sont classés selon l'avis de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO), révisé en 2014, qui se base sur l'extension du cancer au niveau anatomique. En effet, l'extension du cancer est un facteur pronostique majeur et a des conséquences directes sur la prise en charge thérapeutique. (Tableau 1)



Erreur ! Source du renvoi introuvable. Erreur ! Source du renvoi introuvable. Erreur ! Source du renvoi introuvable.

Tableau 1 : Classification FIGO des stades des cancers de l'ovaire, des trompes de Fallope et du péritoine (Mutch and Prat, 2014)

<b>Stade I</b>	Tumeur limitée à un ou deux ovaires ou aux trompes de Fallope
IA	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte ou une trompe de Fallope. Pas de végétations externe, ni de cellules malignes dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
IB	Tumeur limitée aux deux ovaires ou aux trompes de Fallopes. Pas de végétations externe, ni de cellules malignes dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
IC	Tumeur limitée à un ou deux ovaires ou aux trompes de Fallopes avec l'un de ces facteurs suivants :
IC1	Rupture de la capsule pendant l'opération
IC2	Capsule rompue avant l'opération ou présence de tumeur à la surface de l'ovaire ou de la trompe de Fallope
IC3	Cellules malignes présentes dans le liquide d'ascite ou le liquide péritonéal
<b>Stade II</b>	Tumeur atteignant un ou deux ovaires ou trompes de Fallope avec une extension pelvienne ou un cancer péritonéal primaire
IIA	Extension et /ou implantation sur au moins une des organes suivants : utérus, trompes de Fallopes, ovaires
IIB	Extension à d'autres tissus intrapéritonéaux pelviens
<b>Stade III</b>	Tumeur atteignant un ou deux ovaires ou les trompes de Fallopes ou cancer péritonéal primaire avec preuve cytologique et histologique d'extension en dehors du pelvis et/ou métastases au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux
IIIA	Métastases au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux avec ou sans propagation péritonéale microscopique au-delà du pelvis
IIIA1	Résultat cytologique ou histologique positif au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux seulement
IIIA1 (i)	Métastases ≤ 10 mm de dimension maximale
IIIA1 (ii)	Métastases > 10 mm de dimension maximale
IIIA2	Métastases microscopiques extrapelviennes péritonéales avec ou sans résultat positif au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux
IIIB	Métastases macroscopiques péritonéales extra-pelviennes ≤ 2 cm de dimension maximale avec ou sans métastases au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux
IIIC	Métastases macroscopiques péritonéales extrapelviennes > 2 cm de dimension maximale avec ou sans métastases au niveau des nœuds lymphatiques rétropéritonéaux
<b>Stade IV</b>	Métastases à distance en excluant les métastases péritonéales
IVA	Epanchement pleural avec cytologie positive
IVB	Métastases extra-péritonéales

Au niveau cellulaire, les cancers de l’ovaire se subdivisent en plusieurs groupes. On distingue ainsi les tumeurs d’origine épithéliale qui représentent environ 90% des cancers de l’ovaire, les tumeurs d’origine germinale, stromale et les tumeurs qui sont en réalité des métastases d’autres cancers.

Au sein des tumeurs épithéliales, on distingue cinq différents sous-types principaux de tumeurs, classés en fonction de leur histologie. Ainsi, on identifie :

- les cancers séreux, qui sont des tumeurs papillaires et sont subdivisées en deux grades :
  - haut grade (70% des carcinomes ovariens) au sein desquels les cellules sont de taille et de forme différentes. Elles se caractérisent par des atypies nucléaires et possèdent une capacité de prolifération importante. Ce sont les tumeurs séreuses les plus agressives.
  - bas grade (<5%), comprenant des cellules relativement uniformes, avec des petits noyaux et à l’activité mitotique faible.
- endométrioïdes (10%), qui, comme leur nom l’indique, ont une histologie comparable à un adénocarcinome de l’endomètre. Ils ressemblent en effet à une muqueuse endométriale avec un aspect tubulaire, villoglandulaire ou criblé.
- tumeurs à cellules claires (10%), caractérisées par des cellules possédant un cytoplasme abondant et clair causé par la présence de glycogène intracytoplasmique.
- mucineux (3%), possédant une architecture glandulaire avec des cellules stratifiées en colonnes, à noyau basal et caractérisées par des tâches pâles de mucine au niveau du cytoplasme apical. (Prat et al., 2015) (Tableau 2)

**Tableau 2 : Classification des carcinomes ovariens en cinq groupes histologiquement distincts (Prat et al., 2015)**

Sous types	Séreux de haut grade	Séreux de bas grade	Mucineux	Endométrioïdes	Cellules claires
Facteurs de risque	BRCA1/2	?	?	Cancer colorectal héréditaire sans polypose (associé au Syndrome de Lynch)	+/- Cancer colorectal héréditaire sans polypose (associé au Syndrome de Lynch)
Précurseur	STIC	Bordeline séreux	Borderline mucineux	Endométriose	Endométriose
Anomalies moléculaires	P53 BRCA	BRAF KRAS	KRAS HER2	β-cathénines PTEN ARID1A MSI	HNF1b ARID1A PIK3CA MET
Extension	Rapide trans-cœlomique	Trans-cœlomique	Plutôt confiné à l’ovaire	Plutôt confiné au pelvis	Plutôt confiné au pelvis
Chimio-sensibilité	Haute	Intermédiaire	Faible	Haute	Faible
Pronostic	Défavorable	Intermédiaire	Favorable	Favorable	Intermédiaire

**BRAF** : B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma ; **ARID1A** : AT-rich interactive domain-containing protein 1A ; **KRAS** : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog ; **HER2** : Epidermal Growth Factor Receptor-2 ; **MSI** : Microsatellite instability; **HNF1b** : Human hepatocyte nuclear factor-1 beta ; **PI3KA** : Phosphoinositide 3-kinase.

L'Organisation Mondiale de la Santé reconnaît également d'autres sous-types de cancers épithéliaux rares : les tumeurs de Brenner malignes (<0,5% des cancers de l'ovaire) à l'architecture ressemblant à l'épithélium urothélial et les cancers séro-mucineux ou tumeurs mülleriennes mixtes.

Enfin des tumeurs indifférenciées, n'exprimant que faiblement les marqueurs épithéliaux (comme les CK7 ou CK18) et composées de strates de petites ou grosses cellules avec des noyaux pléiomorphes et un index mitotique élevé, sont parfois diagnostiquées. Ces dernières caractéristiques, en font des tumeurs de haut grade.(Devouassoux-Shisheboran and Genestie, 2015)

Une autre classification des cancers de l'ovaire a été proposée par Shih et Kurman en 2004 et révisée en 2016. Elle est basée sur un mode binaire visant à séparer les cancers en fonction de leurs propriétés anatomo-cliniques. En effet, les auteurs de cette classification ont jugé plus approprié de distinguer ces cancers en fonction de leur origine, de leur pronostic et des mutations génétiques qui y sont retrouvées. (Tableau 3)

**Tableau 3 : Classification anatomo-clinique binaire de Shih et Kurman (Kurman and Shih, 2016)**

	Type I	Type II
Fréquence	25%	75%
Type histologique	Carcinomes souvent de bas grade (séreux de bas grade, mucineux, endométrioïde, tumeur de Brenner maligne) à l'exception des carcinomes à cellules claires	Carcinomes de haut grade, carcinomes indifférenciés, carcinosarcomes
Stade de détection	Précoce	Avancé dans la plupart des cas
Prolifération	Généralement lente	Toujours élevée
Ascite	Rare	Fréquent
Réponse à la chimiothérapie	Faible	Bonne (mais rechute ultérieure)
Détection précoce	Possible	Difficile
Progression	Lente et indolente	Rapide et agressive
Devenir clinique global	Bon	Mauvais
Facteurs de risque	Endométriose	Nombre de cycles ovulatoires au cours de la vie, mutations germinales de BRCA
Précurseur	Tumeur borderline	Provient principalement des STICs
Instabilité chromosomique	Faible	Elevée
Mutation de TP53	Rare	Presque toujours
Réparation par recombinaison homologue	Rarement déficiente	Fréquemment déficiente
Mutations actionnables	Peuvent être présentes	Rares

Ces classifications permettent de mieux connaître les caractéristiques des cancers épithéliaux de l'ovaire. Elles permettent également de mettre en évidence le pronostic de réponse au traitement.

Cependant, ce traitement reste le même quelle que soit la classification de la tumeur, et le pronostic est principalement lié à la qualité de la résection chirurgicale.

Au-delà des différences entre les tumeurs, il existe également une hétérogénéité intratumorale dans les cancers. En effet, plusieurs études ont montré que différents prélèvements tumoraux réalisés au niveau de la tumeur primaire, dans différents territoires au sein de celle-ci, et au niveau de métastases chez une même patiente ne présentent pas tous les mêmes altérations génétiques. Dans ce contexte, une étude a mis en évidence, après prélèvement de 31 échantillons tumoraux sur 6 patientes, que les altérations de TP53 étaient ubiquitaires dans les cellules tumorales métastatiques alors que les mutations PI3K $\alpha$  (phosphoinositide 3-kinase alpha), CTNNB1 (Catenin Beta 1) ou encore PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) n'était pas observées dans tous les échantillons, et pouvaient alors aboutir à des dérégulations différentes des voies de signalisation cellulaire (Bashashati et al., 2013).

La construction d'un arbre phylogénétique peut aider à déterminer l'évolution des mutations au cours de la dissémination du cancer, qui ne semble pas linéaire mais plutôt ramifiée. Cette hétérogénéité intra-tumorale complique encore la prise en charge thérapeutique. En effet, l'émergence de thérapies ciblant une altération moléculaire sera efficace contre une partie des cellules tumorales mais pas contre toutes les cellules de la carcinose. De plus cibler les cellules comportant une altération génétique particulière pourra alors favoriser la sélection d'une autre population qui engendrera une rechute de la patiente (Blagden, 2015).

Pour pallier ce problème, des travaux menés par la BRITROC (British Translational Research Ovarian Cancer collaborative) sont en cours pour tenter de réverser l'hétérogénéité tumorale. Ils visent à déterminer les acteurs clés, à différents niveaux (non pas seulement au niveau du génome mais également au niveau de la transcription, expression protéique, immunologique, ou encore épigénétique) qui conduisent à cette hétérogénéité, afin de pouvoir les inhiber (Blagden, 2015).

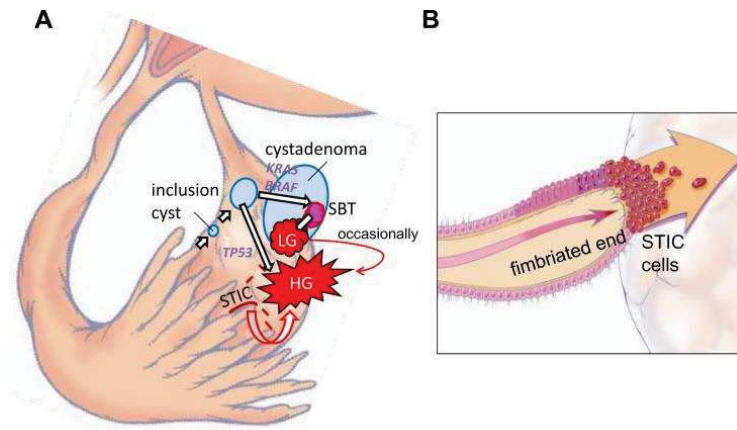
La présence de cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur s'ajoute également à l'hétérogénéité intratumorale. Ces cellules ont des propriétés de cellules souches telles que l'auto-renouvellement, la résistance à l'apoptose induite par une perte d'ancrage et la capacité à se différencier au cours d'une division asymétrique. Elles sont également capables de générer une tumeur respectant l'organisation de la tumeur de laquelle elles proviennent, après transplantation sur un organisme accepteur. Ces cellules sont souvent résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie du fait de leur état quiescent et de l'expression des pompes qui effluent les drogues hors de la cellule. Leur présence pourrait alors expliquer la rechute du cancer après traitement. Par ailleurs, la capacité des cellules cancéreuses à se différencier en cellules souches cancéreuses et à se redifférencier en un autre type cellulaire en fonction de leur microenvironnement, pourrait

également participer à la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi qu'à la transition mésenchymo-épithéliale, facilitant alors le processus d'invasion de la tumeur. Enfin, l'ascite semble être enrichie en cellules souches cancéreuses du fait que ces dernières sont capables de survivre indépendamment de l'attachement à un support. La présence de ces cellules complique encore la prise en charge des cancers de l'ovaire (Lupia and Cavallaro, 2017).

## B. Origines des cancers de l'ovaire

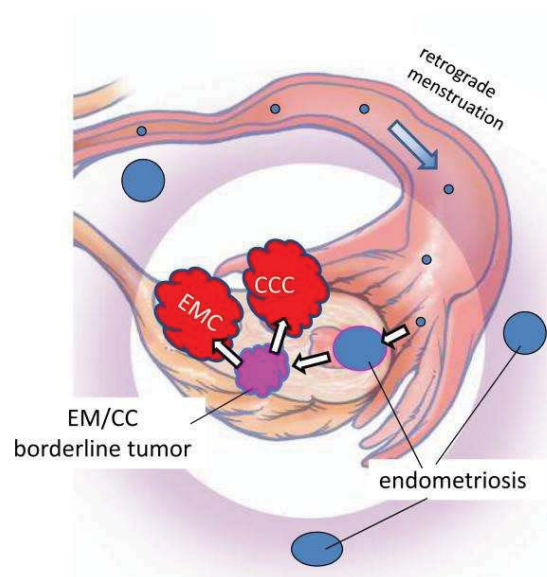
Deux théories coexistent quant à l'origine des cancers épithéliaux. La première, reposant sur l'hypothèse de Fathalla, met en cause l'épithélium de surface ovarien (ESO). Les ruptures et réparations répétées de l'ESO au cours des cycles ovulatoires entraîneraient la formation de kystes d'inclusion dans le cortex ovarien. Ces cellules, à la localisation ectopique, se retrouvent alors exposées au microenvironnement stromal, qui, conjointement avec l'inflammation relative aux cycles ovulatoires pourrait promouvoir leur transformation en cellules cancéreuses (Cardenas et al., 2016). La mise en évidence des facteurs protecteurs visant à réduire le nombre de cycles ovulatoires est en faveur de cette théorie.

La seconde théorie repose sur une origine extra-ovarienne de certains cancers. En effet, des opérations de résections prophylactiques [trompes et ovaires] de femmes à haut risque de développer un cancer de l'ovaire séreux de haut grade, notamment à cause d'une mutation germinale des gènes BRCA1 ou 2, ont permis de mettre en évidence des lésions non pas au niveau des ovaires, mais au niveau des franges des trompes de Fallope. Les cellules cancéreuses migreraient alors au niveau des ovaires entraînant l'apparition de cancers. Ces lésions tubaires, à l'origine des cancers séreux de haut grade, sont appelées «carcinome séreux tubaire intraépithélial non invasif» ou STIC. Un argument en faveur de cette hypothèse est que l'expression des gènes des cellules cancéreuses ovariennes ressemble davantage aux cellules des trompes qu'à celles de l'ESO. En effet, des mutations du gène TP53 identiques ont été retrouvées à la fois au niveau des STIC et des carcinomes séreux de haut grade (Kuhn et al., 2012). Cette théorie semble être la plus probable à ce jour, bien que certains pensent que des cellules saines provenant des franges tubaires puissent migrer au niveau des ovaires, en particulier pendant l'ovulation, et former des kystes d'inclusion et se transformer par la suite en cellules cancéreuses en fonction des mutations acquises. (Kurman and Shih, 2010) (Figure 4)



**Figure 4 : Modèles de développement de carcinome séreux de bas et haut grade. (Kurman and Shih, 2010)**

Les cancers endométrioides et à cellules claires, eux, seraient formés à partir de kystes d'endométriose. Des menstruations rétrogrades permettraient, en effet, l'implantation de cellules de l'endomètre au niveau de l'ovaire. De plus, des observations d'anomalies moléculaires au niveau des tissus endométrioides chez des femmes atteintes d'endométriose, incluant l'activation de voies oncogéniques, confortent cette hypothèse. Par ailleurs, l'effet protecteur de la ligature des trompes, qui empêche ces menstruations rétrogrades, a été mis en évidence uniquement pour ces sous-types cancéreux. (Rosenblatt and Thomas, 1996) (Figure 5)



**Figure 5 : Modèle de développement de carcinomes endométrioides de bas grade et à cellules claires. (Kurman and Shih, 2010)**

Enfin, les cancers mucineux auraient plutôt une origine gastrointestinale. (Kurman and Shih, 2010) En effet, des similarités histologiques rendent complexe la différenciation d'un cancer primitif ovarien ou d'une métastase gastrointestinale. Pour cette raison, lorsqu'un cancer mucineux est dépisté, une fibroscopie et une coloscopie sont également réalisées afin de détecter un éventuel cancer digestif.

### 3. Symptômes et diagnostic

Le diagnostic d'un cancer de l'ovaire peut parfois être posé précocement et en l'absence de symptômes, lors d'un examen de suivi gynécologique ou échographique, par la détection d'une masse annexielle suspecte.

Cependant, dans la majorité des cas, la détection de cette pathologie est réalisée à un stade tardif puisqu'il n'existe pas de signes cliniques particuliers permettant d'évoquer d'emblée la survenue d'un cancer de l'ovaire. Les symptômes qui amènent une patiente à consulter sont en effet très divers, comme par exemple un inconfort abdominal, des douleurs ou symptômes de compression pelvienne ou abdominale, une augmentation du volume abdominal lié à la présence d'une masse ou à la sécrétion d'ascite, des saignements ou pertes vaginales anormales.

Lorsque l'un ou plusieurs de ces symptômes persistent plusieurs semaines et ne sont pas expliqués par une pathologie digestive, un examen clinique doit être effectué. Il doit comporter un examen abdominal, la mesure du poids, les touchers pelviens, une palpation des aires ganglionnaires.

Lorsqu'une tumeur de l'ovaire est suspectée, une échographie abdominopelvienne est effectuée, c'est l'examen de première intention. Si un doute persiste, pour établir un diagnostic différentiel de masses suspectes ou indéterminées, un examen d'imagerie par résonance magnétique peut ensuite être réalisé.

Un dosage sanguin initial du marqueur tumoral CA-125 (Cancer Antigen 125), est également effectué. Cette protéine est observée à la surface de nombreuses cellules cancéreuses, notamment une majorité des cellules cancéreuses ovariennes, et est sécrétée abondamment dans le sang par celles-ci. Cependant, le taux de ce marqueur n'est pas forcément élevé chez les patientes dépistées précocement et, puisque qu'il peut être augmenté lors des règles, d'un début de grossesse ou lors de la survenue d'autres cancers ou d'autres pathologies inflammatoires, il ne peut pas être considéré comme un outil de diagnostic. Le suivi de son taux sanguin pourra néanmoins permettre de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement ou une éventuelle rechute. (Nossov et al., 2008)

Si les examens d'imagerie font suspecter un cancer de l'ovaire, la patiente devra alors bénéficier d'un bilan d'extension, qui sera effectué par tomodensitométrie (Thoraco)-abdominopelvienne, dans le but d'évaluer l'éventuelle étendue à d'autres organes.

Enfin, une biopsie, réalisée par coelioscopie, permettra de déterminer le grade et le type histologique du cancer.

De plus, une recherche de mutations sur les gènes BRCA1 et BRCA2 pourra être réalisée en fonction de l'âge, du type histologique de la tumeur et de l'histoire familiale de la patiente. Ceci aura pour but une adaptation du traitement avec ajout d'un inhibiteur de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) au traitement de référence, l'Olaparib, nouvelle molécule disponible dans l'arsenal thérapeutique et dont le mode d'action sera détaillé dans la sous-partie « Inhibiteurs de PARP ». (guide ALD HAS cancers de l'ovaire, 2010)

## 4. Les traitements de référence

La prise en charge des cancers de l'ovaire est avant tout chirurgicale et la résection complète de la tumeur offre un bien meilleur pronostic pour la patiente, en comparaison à une résection incomplète. (du Bois et al., 2009) (Figure 6)

Si la tumeur est résécable d'emblée, l'opération est proposée en premier lieu et une chirurgie incomplète n'est aujourd'hui plus réalisée.

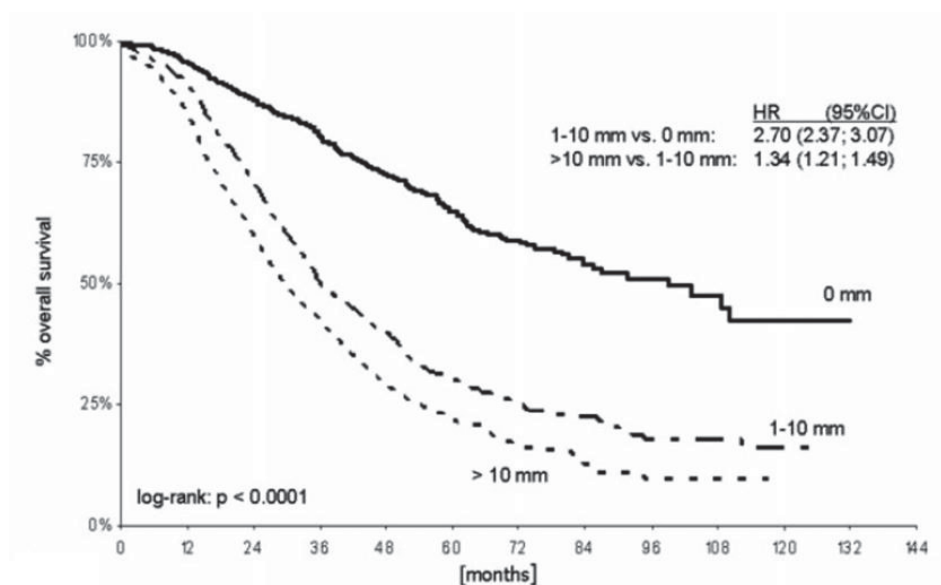


Figure 6 : Impact du résidu post-résection chirurgicale des tumeurs ovariennes sur la survie globale (du Bois et al., 2009)

L'évaluation de la résécabilité de la tumeur, utilise des scores permettant de mettre en évidence l'extension de la carcinose, en complément de la classification FIGO. Ainsi l'indice de Sugarbaker est basé sur un découpage de la région abdomino-pelvienne en neuf zones et permet de calculer un score d'évaluation appelé PCI (Peritoneal Cancer Index) en fonction du nombre de zones atteintes. (Figure 7) Il existe également le score coeloscopique de Fagotti qui comporte plusieurs items : atteinte massive du grand épiploon, carcinose péritonéale, carcinose diaphragmatique, rétraction



mésentérique, infiltration intestinale, infiltration de l'estomac, métastases hépatiques. Chacun de ces items est coté 0 ou 2 en absence ou présence de carcinose et il a été mis en évidence qu'un score supérieur à 8 conduira à une exérèse incomplète chez 100% des patientes opérées.

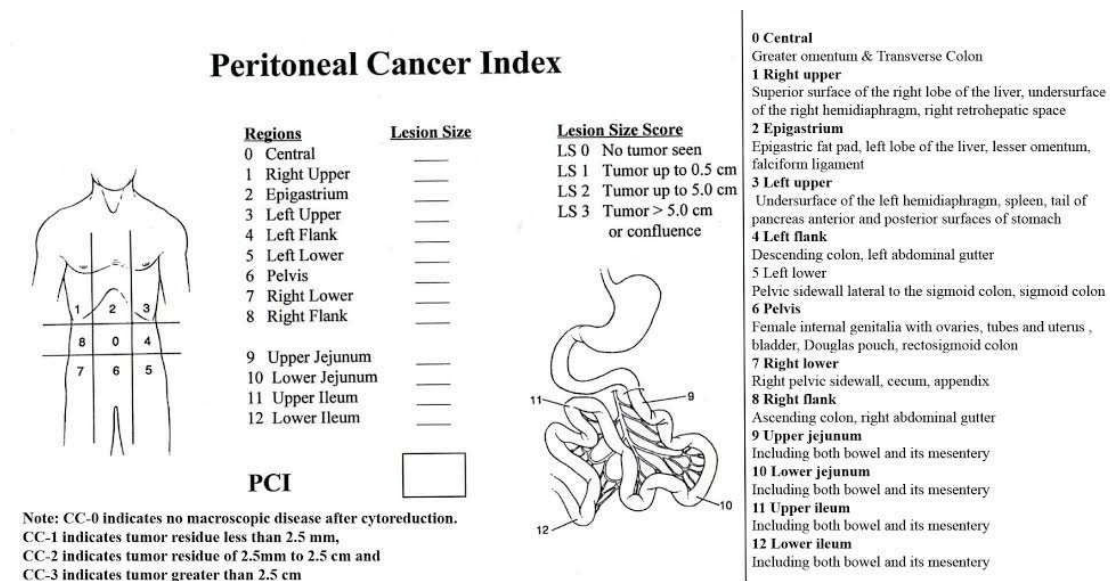


Figure 7 : Score de Sugarbaker. (Padmanabhan et al., 2015)

Selon les recommandations professionnelles de l'INCa concernant le traitement chirurgical du cancer de l'ovaire, pour les stades IA grade A (à l'exception des carcinomes à cellules claires), une chirurgie conservatrice peut éventuellement être proposée à une patiente en âge de procréer. Celle-ci consiste en une annexectomie unilatérale associée à une biopsie et à une surveillance régulière. Une annexectomie contro-latérale sera néanmoins proposée après la/les grossesses et/ou les 40 ans de la patiente.

Pour les autres stades précoces IA IB IC, la chirurgie est réalisée par coelioscopie ou laparotomie et comprend une annexectomie bilatérale et hystérectomie totale, une omentectomie, des biopsies péritonéales multifocales, un curage ganglionnaire pelvien et aortique et une appendicectomie pour les cancers mucineux.

Pour les stades avancés IIA à IV, la chirurgie, réalisée par laparotomie, consiste en plus de celle effectuée pour les stades précoces en une exérèse des éléments suspects comme par exemple le tractus génital ou rectosigmoïde, une exérèse digestive, une péritonectomie, une résection diaphragmatique, une splénectomie ou encore une hépatectomie. Cette exérèse sera réalisée en fonction de l'étendue des lésions et selon l'appréciation du chirurgien.

Dans les nombreux cas où la carcinose est trop étendue, lorsque des métastases à distance sont observées ou lorsque l'état de santé de la patiente ne permet pas l'opération, une chimiothérapie

néo-adjuvante sera mise en place dans un premier temps puis, en fonction de la réponse au traitement, une chirurgie d'intervalle pourra être envisagée.

La chimiothérapie n'est pas recommandée pour les cancers de stade IA et IB de grade I car la tumeur est confinée à l'ovaire, la chirurgie est donc suffisante pour l'éliminer totalement. Elle peut être discutée pour les femmes atteintes de cancers de stade IA et IB grade 2 mais elle n'est pas mise en place dans la plupart des cas.

A partir du stade II, le protocole standard de traitement est composé de six cycles de chimiothérapies en intraveineuse à base de carboplatine et de paclitaxel administrés après chirurgie, espacés de trois semaines.

**Le carboplatine**, fait partie des sels de platine dont le chef de file est le cisplatine. (Figure 8) Tout comme ce dernier, c'est une pro-drogue dont le métabolite actif est le diaquaplatine. Moins toxique que le cisplatine au niveau rénal et neurologique, le carboplatine est un agent alkylant qui possède des propriétés anti-tumorales *via* deux modes d'actions principaux. Tout d'abord, il est capable de former des liaisons covalentes avec des acides aminés tels que la méthionine et des molécules contenant une cystéine (glutathion réduit et métalloprotéines), ce qui a pour conséquence de dépléter le cytoplasme cellulaire de ses agents réducteurs et donc de provoquer un stress oxydatif au sein de la cellule. Par ailleurs, ce dérivé du platine va se lier de façon covalente aux bases puriques de l'ADN et ainsi créer des adduits qui vont former des ponts intra-brins et inter-brins. Ces liaisons vont alors empêcher la réplication de l'ADN et, en l'absence de réparation, conduire les cellules dans un état de sénescence (état d'arrêt de prolifération cellulaire) ou à la mort par apoptose. Ces adduits vont également empêcher la synthèse protéique en perturbant la transcription de l'ADN en ARN messenger (Galluzzi et al., 2014).

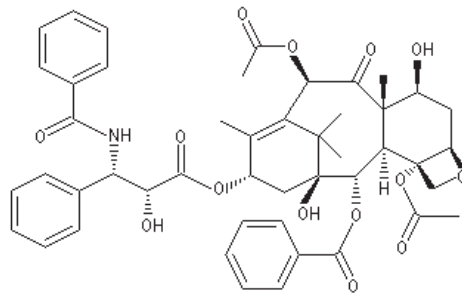
Les principaux effets secondaires du traitement par le carboplatine sont des nausées et vomissements ainsi qu'une toxicité hématologique liée à l'altération des performances de la moelle osseuse.



Figure 8 : Structures chimiques du cisplatine et du carboplatine.

**Le Paclitaxel**, est un taxane (diterpène) extrait de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*). (Figure 9) Il se lie à l'extrémité amino-terminale de la  $\beta$ -tubuline, empêchant alors le phénomène de dépolymérisation des microtubules. Cette perturbation du mécanisme dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules, essentiel à la progression dans le cycle cellulaire, bloque alors la cellule entre la métaphase et l'anaphase. En effet, lorsque la dépolymérisation des microtubules est bloquée, l'attraction des chromatides aux deux pôles opposés de la cellule n'est plus possible (Kavallaris, 2010). Par ailleurs, selon le contexte cellulaire, cette molécule est capable d'induire la mort cellulaire par activation de la voie intrinsèque de l'apoptose notamment en inactivant par phosphorylation la molécule anti-apoptotique Bcl-2 ou en provoquant la déséquestration de la molécule proapoptotique Bim des microtubules. Le mécanisme d'induction par le Paclitaxel de la phosphorylation de Bcl-2 n'est pas clairement décrit mais plusieurs hypothèses co-existent : une phosphorylation par différentes kinases notamment c-Jun N-terminal kinase (JNK) ou une phosphorylation dépendante de la phase du cycle cellulaire (Bhalla, 2003). Le pro-apoptotique Bim, qui peut être lié aux microtubules, est décroché après traitement au Paclitaxel et peut alors être transloqué au niveau de la mitochondrie et participer à l'induction de l'apoptose. Les lignées comportant un fort taux de Bim sont alors plus sensibles à l'action du Paclitaxel (Li et al., 2005).

Le traitement par le Paclitaxel induit de nombreux effets secondaires, en particulier une toxicité hématologique, une neuropathie ou une alopecie.



**Figure 9 : Structure chimique du Paclitaxel.**

Outre l'administration de la chimiothérapie en intraveineuse, l'utilisation de la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) est aujourd'hui à l'étude après résection de toute la carcinose péritonéale visible. Elle consiste à administrer la chimiothérapie à forte concentration, haute température (43°C) directement dans la cavité péritonéale ouverte ou fermée afin de favoriser son activité sur les résidus de carcinose péritonéale peu vascularisés. L'essai clinique multicentrique de phase III CHIPOR (Hyperthermic Intra-Peritoneal Chemotherapy in Relapse Ovarian Cancer Treatment) en cours et auquel participe le centre de lutte contre le cancer François Baclesse devra

permettre de déterminer l'éventuel bénéfice de cette technique. Il recrute des patientes présentant une récurrence intra-péritonéale, ayant reçu une seconde ligne de chimiothérapie sensible au platine et pour laquelle la tumeur est préalablement résectable.

Depuis quelques années, un anti-angiogénique, le **Bévacizumab** peut être ajouté à la combinaison Carboplatine/Paclitaxel.

L'angiogenèse correspond à la mise en place d'un réseau vasculaire intratumoral, et représente une étape indispensable à la progression tumorale. Bloquer ce phénomène, semble donc une stratégie antitumorale pertinente. Le degré de vascularisation des tumeurs ovariennes a d'ailleurs une valeur pronostique (Labiche et al., 2009). En outre, le VEGF (Vascular Growth Factor) et son récepteur, le VEGFR (Vascular Growth Factor Receptor), sont surexprimés dans les cancers de l'ovaire (Grunewald and Ledermann, 2017). Dans ce cadre, le bévacizumab (ou Avastin™), anticorps monoclonal de type IgG1, agit en se fixant au VEGF, ce qui empêche alors la fixation de ce dernier à ses récepteurs VEGFR-1 et -2 des cellules endothéliales et inhibe donc le développement de ces cellules. (Figure 10)

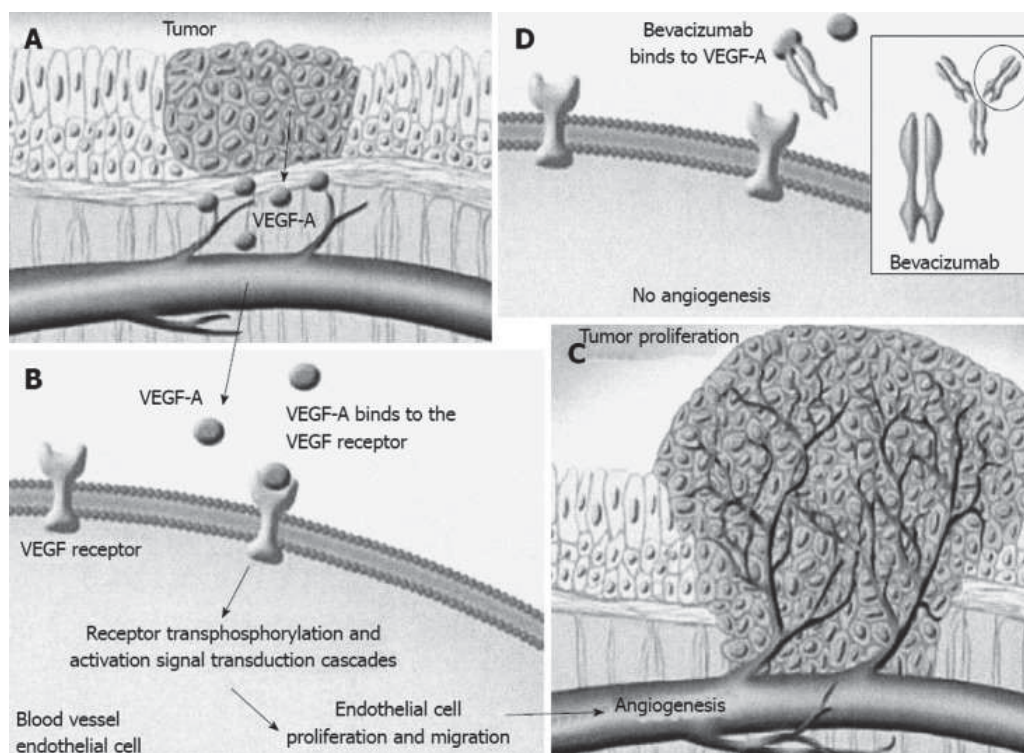


Figure 10 : Processus de l'angiogenèse et mécanisme d'action du bévacizumab.

A : Les cellules malignes sécrètent du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A ; B : Ce composé est capté par ses récepteurs à tyrosine kinase (VEGFRs), ce qui va promouvoir la prolifération et la migration des cellules endothéliales ; C : cela conduit à l'augmentation de l'angiogenèse, induisant la croissance tumorale ; D : le Bévacizumab lie le VEGF-A qui perd alors sa capacité de se lier à ses récepteurs ; empêchant alors sa fixation et son action, et inhibe l'angiogenèse (Shord et al., 2013).

Plusieurs études cliniques de phase III ont permis de mettre en évidence un bénéfice à l'utilisation de cet antiangiogénique dans le traitement des cancers de l'ovaire. Deux études, ont évalué l'effet de

cette molécule en première ligne. La première (ICON-7) qui consistait à comparer l'effet de l'ajout de bévacizumab, à 7,5 mg/kg, à la combinaison carboplatine-paclitaxel, puis de le laisser en maintenance, a permis d'augmenter d'1,7 mois la survie sans-progression des patientes (Perren et al., 2011). La seconde (GOG218), comparait l'effet du traitement classique carboplatine-paclitaxel en association avec le bévacizumab à la dose de 15 mg/kg versus un placebo, ainsi que l'effet d'un traitement d'entretien. Les résultats ont montré un bénéfice de la survie sans progression de 0,9 mois avec l'ajout de la molécule à la combinaison de référence et de 3,8 mois lorsque le traitement était maintenu (Burger et al., 2011). La molécule a ainsi obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2012 pour le traitement en première ligne à partir du stade FIGO IIIB pour les cancers de l'ovaire, des trompes et du péritoine primitif.

Trois autres études ont évalué l'effet du bévacizumab après une rechute du cancer. Les deux premières ont été réalisées sur des patientes sensibles au platine. La première (OCEANS) comparait l'effet du traitement carboplatine *versus* carboplatine+bévacizumab et la seconde (GOG 0213), l'effet des combinaisons gemcitabine+carboplatine avec ajout ou non de bévacizumab. Les résultats ont permis de mettre en évidence des augmentations de la survie sans progression de 3,4 et de 4 mois (Grunewald and Ledermann, 2017 ; Aghajanian et al., 2015). Enfin, une dernière étude (AURELIA), chez des patientes résistantes au platine a permis d'augmenter de 3,3 mois la survie sans progression des patientes traitées en combinaison avec du paclitxel, de la doxorubicin ou du topecan (Pujade-Lauraine et al., 2014). Ces études ont abouti à une autorisation de mise sur le marché du bévacizumab pour le traitement des patientes dès la première récurrence (sensible ou résistante au platine) en association avec un ou plusieurs autres agents thérapeutiques et à la condition qu'il n'y ait pas eu de traitement préalable avec cette molécule.

Les effets secondaires les plus fréquents sont : l'hypertension artérielle, la protéinurie, le risque accru d'embolie pulmonaire et des toxicités gastrointestinales.

Ce traitement, perturbant le mécanisme de vascularisation, ne sera par ailleurs mis en place qu'un mois minimum après une intervention chirurgicale, la cicatrisation complète étant indispensable. La dose recommandée est de 15 mg/kg toutes les trois semaines.

Cependant, l'effet de cette molécule est soumis à controverses. Cette molécule a en effet été classée comme ayant un service médical rendu important, or dans les études OCEAN et AURELIA, l'administration de cette molécule a engendré une toxicité, conduisant à un arrêt du traitement chez 19,8% et 43,6% des patientes respectivement. Par ailleurs ce traitement n'a été associé qu'à une augmentation modeste de la survie sans progression, sans amélioration de la survie globale ni de la qualité de vie. La commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé du 3 Avril 2015 (CT-

13934) a donc jugé que le bévacizumab n'apportait pas d'amélioration du service médical rendu pour les cancers de l'ovaire en rechute sensible ou résistante.

## 5. Le problème de la chimiorésistance

La chimiorésistance est un problème majeur qui limite l'efficacité de la chimiothérapie dans le traitement des cancers de l'ovaire.

Les patientes sont classées en fonction de leur sensibilité à la chimiothérapie au carboplatine. Elles sont dites « réfractaires » lorsque la tumeur progresse sous chimiothérapie ou dans le mois qui suit la dernière cure, « résistantes » lorsqu'une rechute apparaît entre 1 et 6 mois après traitement, de « sensibilité intermédiaire » quand la progression tumorale réapparaît 6 à 12 mois après chimiothérapie et « sensibles » lorsque l'intervalle entre le traitement et la récurrence est supérieur à 12 mois.

La résistance aux dérivés du platine est liée à différents mécanismes, indépendants les uns des autres. La résistance peut, en premier lieu, se manifester avant que ces molécules n'atteignent leur cible. En effet, le platine étant majoritairement introduit et extrait de la cellule par des transporteurs actifs du cuivre, l'altération de l'expression, de la localisation subcellulaire et/ou de la fonctionnalité de ces transporteurs, comme par exemple CTR1 (copper transporter 1 ; responsable d'une entrée massive de cisplatine) ou ATP7B (ATPase,  $\text{Cu}^{2+}$  transporting  $\beta$  polypeptide, permettant l'efflux de cisplatine) est associée à une résistance au cisplatine. D'autres transporteurs au niveau de la membrane plasmique peuvent être responsables du rejet massif du platine en dehors de la cellule, c'est le cas de la protéine MRP2 (multidrug associated protein 2) et de l'ATP11B (ATPase de classe IV, type B). Par ailleurs, une élévation du niveau du glutathion, des enzymes responsables de sa synthèse ou qui permettent la liaison du platine à celui-ci ainsi que l'augmentation du taux de métalloprotéines pourrait permettre une résistance des cellules en augmentant la capacité du cytoplasme à séquestrer le platine (Galluzzi et al., 2014).

Dans un second temps, la résistance au platine peut avoir lieu au niveau de sa cible, l'ADN et implique les mécanismes de réparation de ce dernier. En effet, une augmentation de la capacité des cellules à mettre en place le système de réparation par excision de nucléotide (NER), permet alors de réparer la majorité des dommages à l'ADN créés par le platine, et d'induire une résistance à ce composé. Par ailleurs, une mutation des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements, système capable de détecter les adduits à l'ADN puis d'enclencher leur réparation et un signal apoptotique en cas d'échec de celle-ci, tels que MLH1 ou MSH2, est souvent retrouvée dans les cellules chimiorésistantes. Au contraire, une expression élevée des protéines impliquées

dans ce système de réparation aurait un effet protecteur contre la chimiorésistance, peut-être parce que ce phénomène éviterait l'accumulation d'altérations génétiques supplémentaires. Enfin, les cellules cancéreuses comportant une mutation « perte de fonction » des gènes BRCA1 ou BRCA2, impliqués dans le système de réparation des cassures double-brins, sont plus sensibles aux effets du platine ; l'apparition d'une mutation compensatoire restaurant alors la fonction de ce processus favorise la chimiorésistance. Ce phénomène a été mis en évidence sur des cellules de cancer du sein, du pancréas et des tissus ovariens tumoraux ayant acquis une seconde mutation sur le gène BRCA2 (Sakai et al., 2008).

Enfin, la résistance à la mort peut persister même lorsque l'ADN est endommagé, notamment à cause d'une dérégulation des niveaux d'expression et d'activation des membres de la famille Bcl-2 contrôlant la mort cellulaire par apoptose (comme vu plus loin) (Galluzzi et al., 2014) (Figure 11)

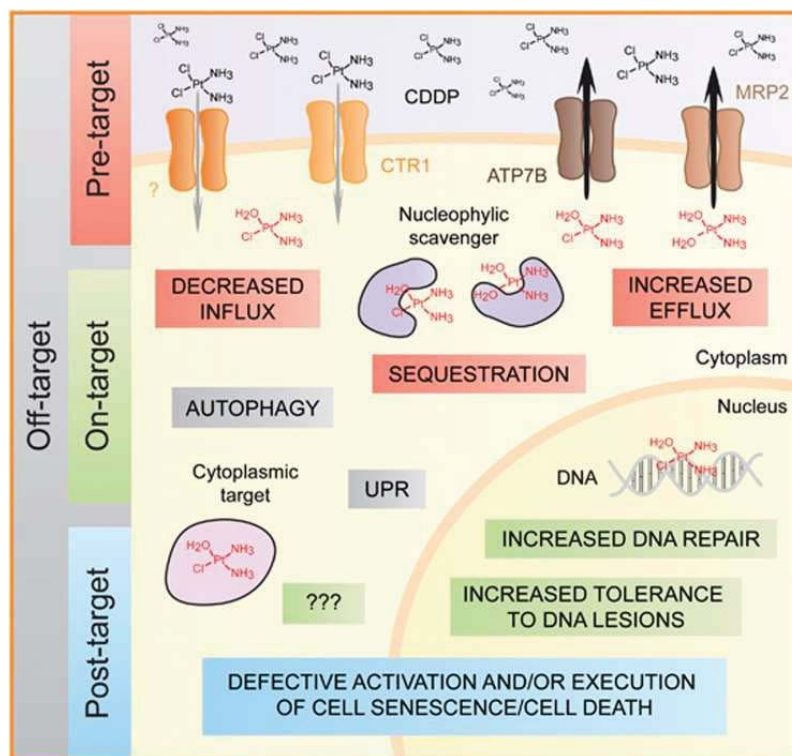


Figure 11: Mécanismes moléculaires de la résistance au cisplatine (Galluzzi et al., 2014).

Les cellules cancéreuses peuvent perdre leur sensibilité aux effets cytostatiques/cytotoxiques du cisplatine (CDDP) grâce à un large panel de modifications génétiques et épigénétiques. Ces altérations peuvent (i) affecter des processus qui précèdent la liaison du CDDP avec ses cibles (pre-target resistance) ; (ii) potentialiser la capacité des cellules à réparer les dommages moléculaires causés par le CDDP (on-target resistance) ; (iii) altérer la transmission du signal normalement relayé suite à des dommages provoqués par le CDDP et conduisant la cellule dans un état de sénescence ou à l'apoptose (post-target resistance) ou (iv) stimuler la libération de signaux de survie qui abolissent la cytotoxicité du CDDP, alors qu'ils ne sont pas normalement provoqués par cette drogue (off-target resistance). ATP7B, ATPase, Cu<sup>2+</sup> transporting,  $\beta$  polypeptide; CTR1, copper transporter 1; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; UPR, unfolded protein response. Le diaquaplatine est représenté en rouge.

En cas de rechutes précoces (patientes réfractaires ou résistantes au platine), des monochimiothérapies peuvent être mises en place. Les recommandations de Saint Paul de Vence de

2016 du groupe ARCAGY-GYNECO (Association de Recherche sur les Cancers dont Gynécologiques - Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Étude des Cancers Ovariens et du sein) préconisent par exemple une monochimiothérapie à base de paclitaxel seul en cures hebdomadaires ou de topotecan (inhibiteur de la topo-isomérase I, qui, en stabilisant cette dernière sur l'ADN au moment de la réplication, aura pour conséquence la création de cassures mono-brin) ou doxorubicine lyposomale pégylée (intercalant de l'ADN et inhibiteur de la topo-isomérase II), avec ajout de bévacizumab si celui-ci n'avait pas été introduit au protocole de traitement antérieur.

En cas de rechute tardive, différents protocoles thérapeutiques peuvent être mis en place :

- Une monothérapie à base de carboplatine
- Des combinaisons avec carboplatine : paclitaxel-carboplatine, doxorubicine-carboplatine, gemcitabine (inhibiteur de la phase de réplication de l'ADN) -carboplatine+/-bévacizumab
- Des combinaisons sans carboplatine comme doxorubicine-trabectédine (molécule qui en se fixant à l'ADN, perturbe la transcription, la réparation de celui-ci et le cycle cellulaire)

Par ailleurs, il existe aussi des phénomènes de résistance aux Taxols qui, comme pour le platine, se révèlent être multiples et interviennent à différents niveaux. Tout d'abord, un efflux excessif de Paclitaxel par des transporteurs transmembranaires comme la P-glycoprotéine empêchera son accumulation. Ensuite, il a été montré au niveau de différentes lignées cellulaires cancéreuses, notamment ovariennes (1A9PTX10 et 1A9PTX22) qu'une mutation sur le gène codant pour la  $\beta$ -tubuline pourrait perturber la fixation de la drogue à sa cible (Giannakakou et al., 1997). Cependant, ce phénomène ne semble pas être retrouvé au niveau clinique (Berrieman et al., 2004). Par ailleurs, une variation des niveaux d'expression des isoformes de la tubuline peut expliquer une différence dans la sensibilité des cellules aux taxanes. En effet, à un niveau élevé de l'expression de la  $\beta$ III-tubuline, l'isoforme permettant la fabrication d'un microtubule hypostable, est associé à une chimiorésistance. Une modulation de l'expression des protéines associées aux microtubules, comme par exemple une surexpression de MAP2 ou  $\tau$ , qui encombrant alors le site de fixation aux taxanes, serait également responsable d'une résistance à ces traitements. Enfin, tout comme pour le carboplatine, des dérégulations de l'expression des molécules impliquées dans le processus apoptotique, tels que les membres de la famille Bcl-2, peuvent expliquer ce phénomène de résistance (Kavallaris, 2010)(Figure 12)



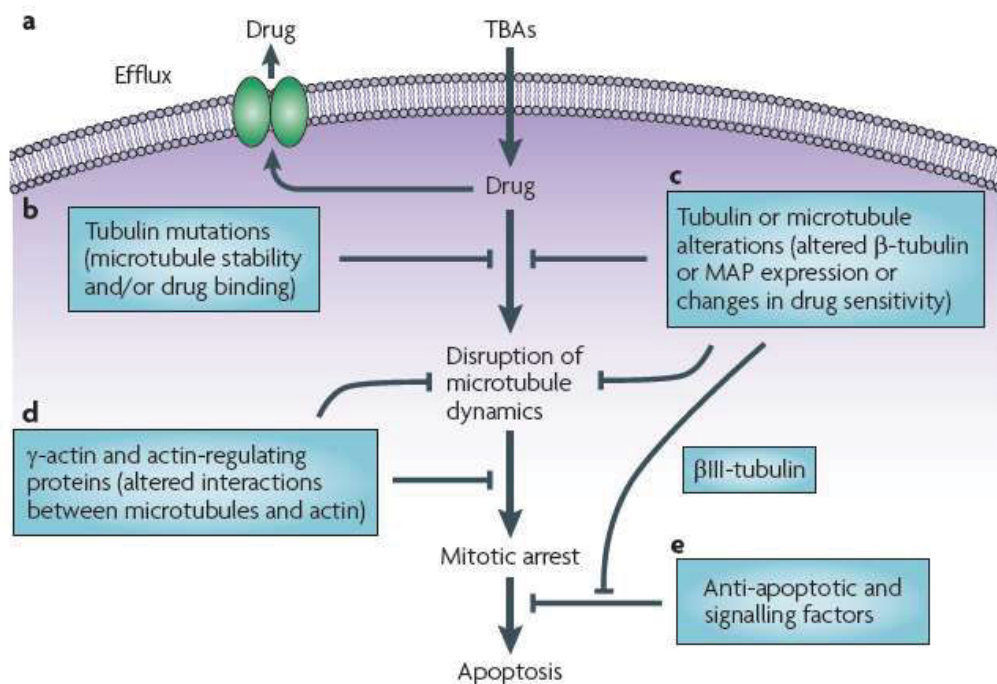


Figure 12 : Mécanismes moléculaires de la résistance aux taxols (Kavallaris, 2010).

a. Une diminution de l'accumulation de la molécule due à la surexpression des transporteurs transmembranaires tels que la P-glycoprotéine permettant l'efflux de la molécule. b. une altération directe de la liaison de la drogue avec sa cible *via* une mutation, au niveau de lignées cellulaires chimiorésistantes. c. une altération de l'expression des isotypes de la tubuline ou de l'expression des protéines associées aux microtubules qui réduisent l'efficacité de la drogue. d. des changements des microtubules induits par des interactions ou la régulation par d'autres protéines du cytosquelette. Par exemple, la  $\gamma$ -actine ou les protéines régulant l'actine peuvent affecter la capacité de ces drogues à induire un arrêt de la mitose et la mort cellulaire. e. Des défauts au niveau des voies de l'apoptose influencent aussi la résistance à ces agents.

## 6. Développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour pallier le manque d'efficacité de la chimiothérapie

La cancérogénèse est un processus complexe et multi-factoriel de transformation de cellules aboutissant à la formation d'une tumeur à la croissance incontrôlée et capable d'aller envahir différents autres organes. En effet, les cellules acquièrent des propriétés particulières décrites par Hanahan et Weinberg, comme par exemple une activation continue des facteurs de croissance, une dérégulation du métabolisme énergétique, une induction de l'angiogenèse, une capacité à migrer et à métastaser ou encore une résistance à la mort cellulaire. L'ensemble de ces propriétés peuvent permettre aux cellules d'échapper à la mort induite par les traitements conventionnels et sont à l'heure actuelle des cibles pour le traitement des cancers (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 13)

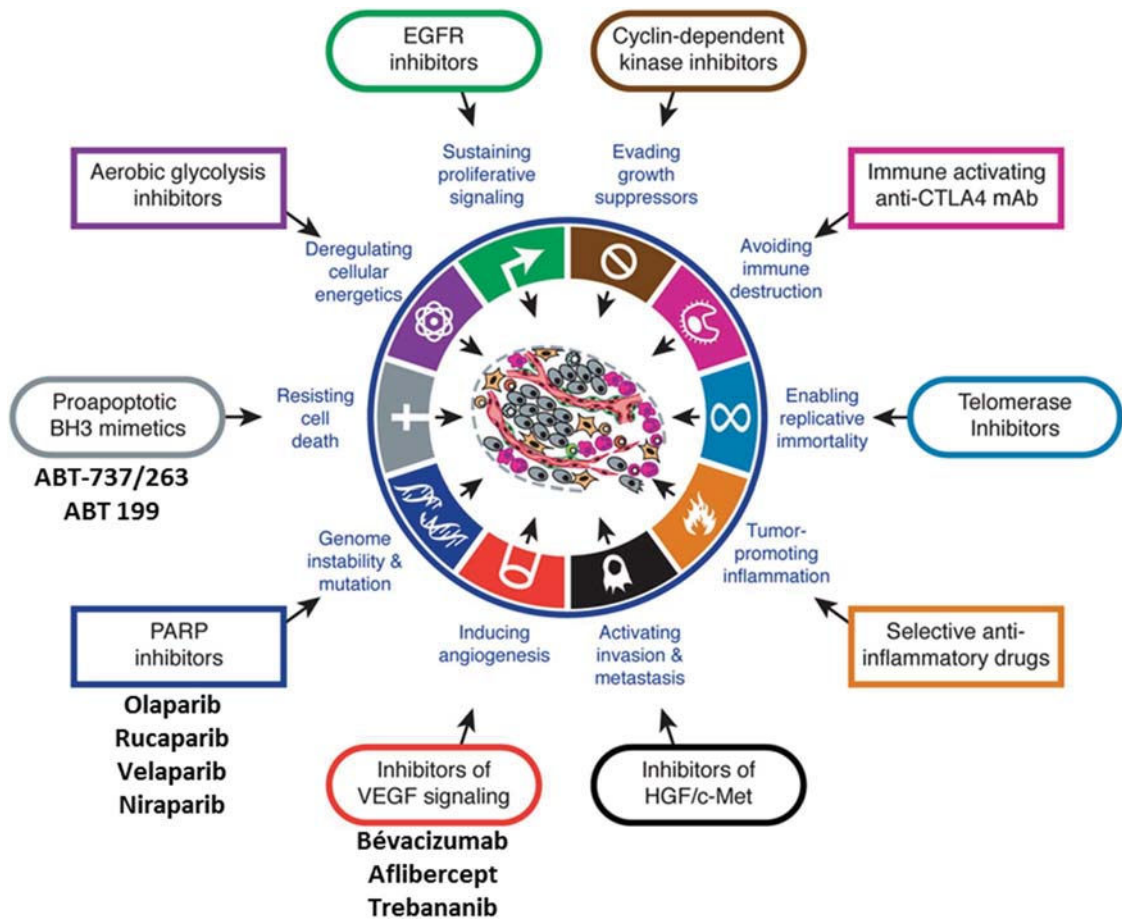


Figure 13 : Thérapies ciblant les caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Des molécules pharmacologiques qui interfèrent avec chacune des capacités cellulaires acquises nécessaires à la croissance et à la progression tumorale ont été développées, sont en essais cliniques ou dans certains cas approuvés pour une utilisation en clinique pour le traitement de certaines formes de cancer humain.

Au niveau de la prise en charge des cancers de l’ovaire, de nombreuses molécules, visant à cibler chacune de ces propriétés sont aujourd’hui en développement et commencent progressivement à venir élargir l’arsenal thérapeutique. (Petrillo et al., 2016) (Figure 14)

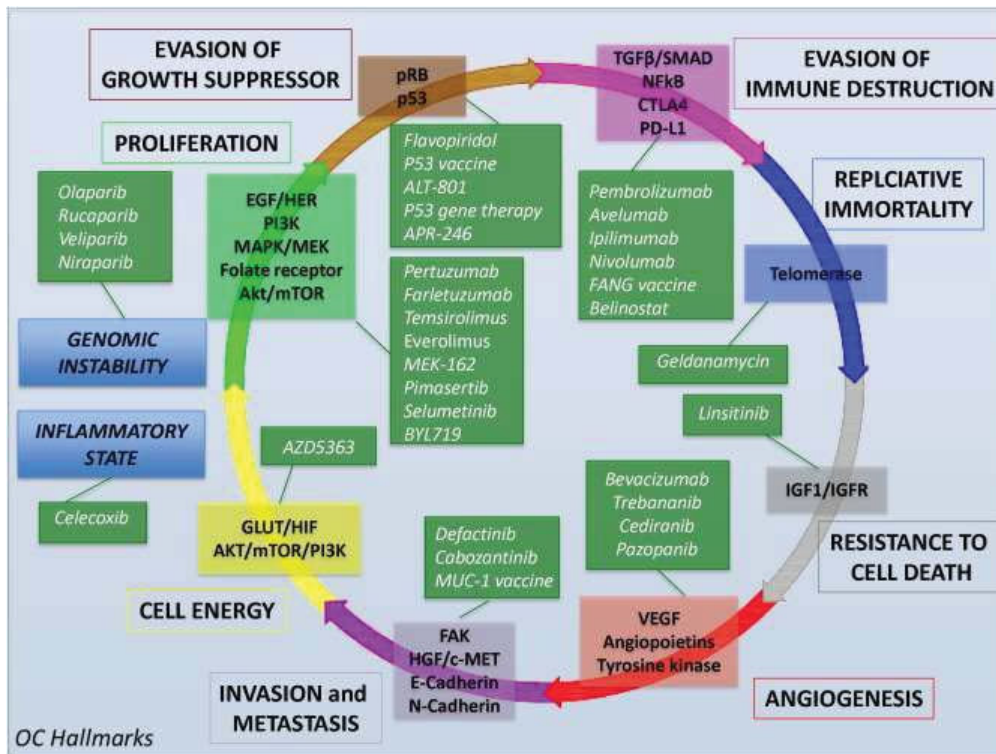


Figure 14 : Caractéristiques tumorales et exemple de médicaments approuvés ou en évaluation dans les cancers de l’ovaire (Petrillo et al., 2016).

Parmi ces nouvelles molécules, de nombreux antiangiogéniques, des inhibiteurs de PARP et des molécules permettant de restaurer la mort cellulaire par apoptose, notamment en ciblant les dérégulations de la famille Bcl-2, donnent des résultats très prometteurs.

## A. Les anti-angiogéniques

Bien que le Bévacizumab soit déjà en clinique, d’autres antiangiogéniques, ciblant le VEGF, comme l’Aflibercept, utilisé pour le traitement de cancers colorectaux métastatiques, ou le Trebananib sont aujourd’hui en essais cliniques. Un essai clinique de phase II a montré que l’Aflibercept permet notamment d’augmenter l’espacement entre deux ponctions d’ascite chez des patientes à la sécrétion d’ascite récurrente (ce temps passe de 31,8 jours avec le placebo à 55,1 jours sous Aflibercept). L’essai Trinova-1 (de phase III), du Trebananib combiné au paclitaxel effectué chez des patientes ayant rechuté moins d’un an après la dernière cure de platine, a permis de montrer une augmentation de la survie sans progression d’1,8 mois (Gotlieb et al., 2012 ; Monk et al., 2014)

Il existe également des anti-angiogéniques multi-cibles qui se lient au site catalytique de liaison à l’ATP de plusieurs récepteurs à tyrosine kinase, incluant le VEGFR. Ces molécules sont attrayantes car elles sont capables d’inhiber plusieurs voies de signalisation, ce qui pourrait conduire à une meilleure inhibition de l’angiogénèse. Cependant, leurs modes d’actions complexes conduisent également à

une augmentation de la toxicité de ces agents. Parmi les molécules en essais cliniques, on distingue par exemple le Sorafenib qui inhibe notamment VEGFR-2, VEGFR-3, Raf-1 et PDGFR- $\beta$  ( $\beta$ -type platelet-derived growth factor receptor) ou le Nintedanib, inhibant les VEGFR, FGFR et le PDGFR (Grunewald and Ledermann, 2017).

## B. Les inhibiteurs de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase)

Les PARP composent une grande famille d'enzymes impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la régulation de la transcription, les modifications de la chromatine, la mitose, la mort cellulaire ou encore la réparation de l'ADN. Au niveau de ce dernier processus, les PARP interviennent pour réparer les lésions de l'ADN simple-brin *via* le mécanisme de réparation par excision de base (BER).

L'inhibition de l'activité des PARP va empêcher la réparation des cassures simple-brin, qui, au cours de la réplication de l'ADN vont engendrer des cassures double-brin. Cependant, un autre mécanisme de réparation de l'ADN impliquant les protéines BRCA1 et 2 prendra le relais, en réparant ces lésions double brin. Ce dernier processus, appelé recombinaison homologue, fait intervenir de nombreuses molécules et consiste à recréer un ADN double brin intact à partir d'une séquence d'ADN identique au sein du génome, dont les brins serviront de guides pour la synthèse.

Dans ce contexte, les inhibiteurs de PARP, en bloquant le mécanisme de réparation par excision de base, ont montré des résultats très intéressants dans le traitement des cancers du sein et de l'ovaire chez des patientes ayant une mutation du gène BRCA1 ou BRCA2. Cette efficacité est basée sur le concept de létalité synthétique illustré ci-dessous. Il repose sur le principe selon lequel l'inhibition simultanée de l'expression de deux protéines intervenant dans deux mécanismes différents, eux-mêmes impliqués dans la réalisation d'un même grand processus cellulaire, conduit la cellule à la mort, alors que l'inhibition d'une seule n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire (O'Neil et al., 2017) (Figure 15).

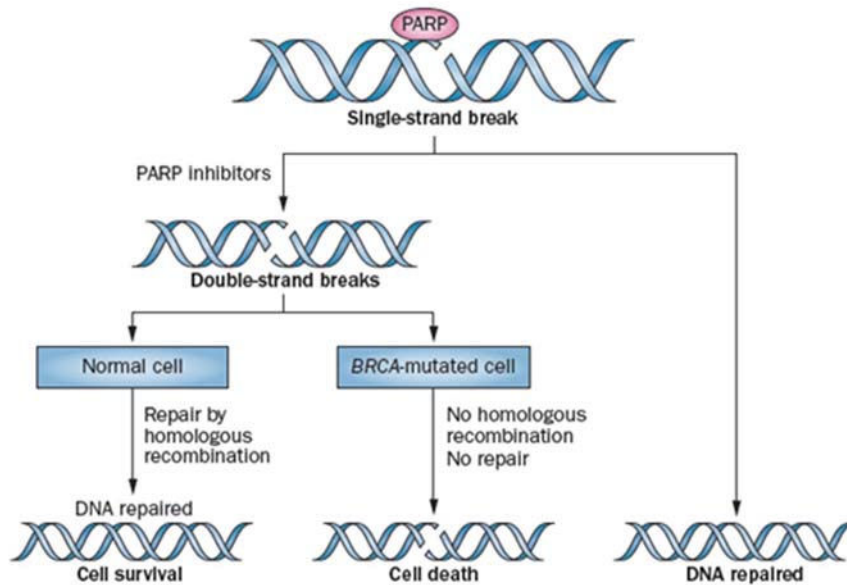


Figure 15 : Rôle des inhibiteurs de PARP dans la létalité synthétique (Sonnenblick et al., 2015).

Les enzymes PARP jouent un rôle clé dans la réparation des dommages à l'ADN. En effet, PARP1 se lie au niveau de cassures simple-brin de l'ADN et recrute d'autres enzymes pour réparer le dommage à l'ADN. L'échec de réparation des cassures simple-brin peut engendrer des cassures double-brin pendant la réplication de l'ADN ; l'inhibition de PARP peut donc engendrer des dommages à l'ADN supplémentaires. Cependant, les dommages à l'ADN, qui se produisent fréquemment à chaque cycle cellulaire peuvent aussi être réparés par le mécanisme de réparation homologue. Les gènes BRCA1 et BRCA2 codent pour des protéines clés de cette voie de recombinaison homologue, par conséquent, les tumeurs BRCA-mutées ont des déficiences au niveau de la réparation de l'ADN. Cette vulnérabilité est à la base de la thérapie ciblée basée sur le concept de létalité synthétique avec des inhibiteurs PARP pour des patients avec un cancer BRCA-muté. Les dommages à l'ADN qui apparaissent après l'inhibition de l'activité de PARP ne peuvent pas être réparés correctement dans ces cancers, il en résulte alors une instabilité chromosomique, un arrêt du cycle cellulaire et par la suite une mort cellulaire par apoptose. Comme les processus de réparation de l'ADN demeurent intact dans les cellules non cancéreuses, qui conservent généralement au moins une copie fonctionnelle (ou les deux) de BRCA1 et BRCA2, l'inhibition de PARP devrait cibler sélectivement les cellules cancéreuses, épargnant les tissus normaux.

Le chef de file des inhibiteurs de PARP est l'Olaparib. Dans le cadre d'un essai clinique de phase II, l'administration de cette molécule *versus* un placebo a permis d'augmenter de 6,9 mois la survie sans progression chez des patientes atteintes de cancers de l'ovaire séreux, trompes ou péritoine primitif en rechute. Ces patientes étaient toujours sensibles au platine et présentaient une mutation de BRCA (Ledermann et al., 2014). Cette molécule a reçu une autorisation de mise sur le marché en France en 2014 et est actuellement utilisée en traitement d'entretien en monothérapie à la dose de 400 mg par jour, chez des patientes atteintes d'un cancer épithélial séreux de haut grade récidivant sensible au platine et présentant une mutation du gène BRCA1 ou 2. Ses principaux effets secondaires sont la fatigue, des nausées et une anémie.

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de PARP ne sont pas recommandés en traitement néo-adjuvant. D'autres molécules sont actuellement en essais cliniques, notamment le Rucaparib, le Velaparib ou encore le Niraparib. Ce dernier, en comparaison avec l'administration d'un placebo, a permis de prolonger la survie sans progression de 15 mois chez des patientes atteintes de cancers de l'ovaire en

récidive sensibles au platine et ayant une mutation au niveau des BRCA1 ou 2. Par ailleurs, une augmentation de la survie sans progression de 9,1 mois pour des patientes ayant une autre déficience connue au niveau de la recombinaison homologe et de 5,4 mois chez des patientes n'ayant pas de mutation au niveau de ce système de réparation a également été mise en évidence, ce qui pourrait déboucher sur un élargissement du champ d'application de ces molécules. (Mirza et al., 2016) (Figure 16)

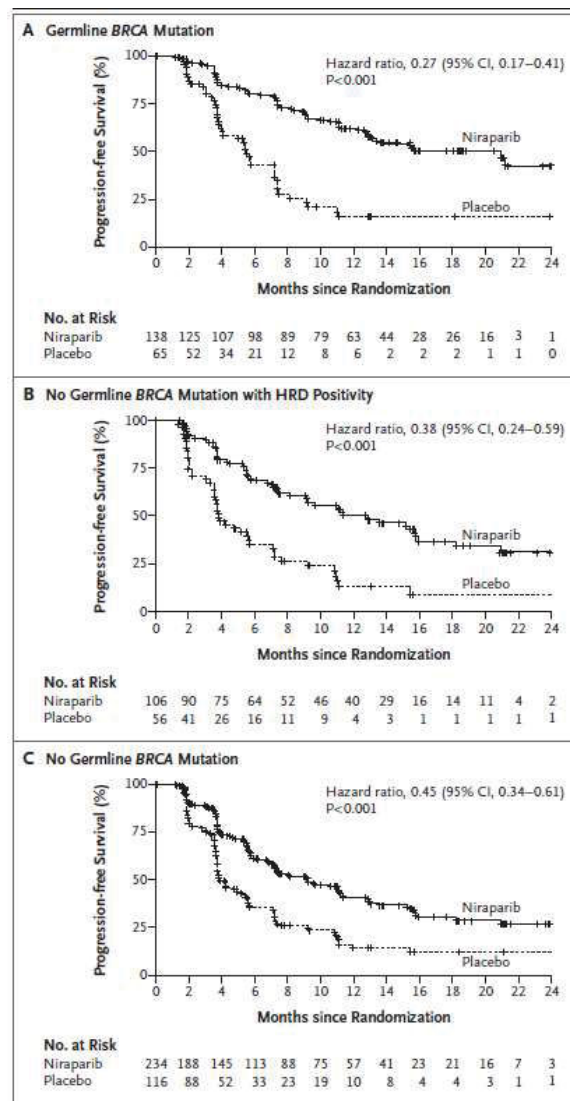


Figure 16 : Survie sans progression des patientes traitées avec le Niraparib *versus* placebo (Mirza et al., 2016). A. avec un statut BRCA muté au niveau germlinal, B. avec une déficience au niveau des mécanismes de recombinaison homologue connue autre que sur les gènes BRCA, C. sans mutation au niveau de BRCA.

Cependant, là encore, les cellules tumorales sont capables de développer des mécanismes de résistance à cette classe de molécules. L'efflux de ces molécules par des transporteurs ou une mutation restauratrice pourrait principalement expliquer l'échappement au traitement.

## C. L'immunothérapie

L'immunothérapie est un type de traitement qui va permettre au système immunitaire du patient de lutter contre ses propres cellules cancéreuses.

Dans le traitement des cancers de l'ovaire, la stratégie principale envisagée actuellement vise à stimuler la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Elle va en effet cibler l'interaction PD-1 (Programmed cell Death 1)-PDL-1 (Programmed death-ligand 1). PD-1 est une immunoglobuline située à la surface des lymphocytes T, cellules du système immunitaire qui sont capables de reconnaître les cellules tumorales. Cependant, l'expression de PDL-1 à la surface des cellules tumorales et son interaction avec PD-1, va empêcher l'activation des lymphocytes T. Des anticorps dirigés contre PD-1 ou PDL-1 ont alors été conçus pour empêcher cette interaction et restaurer l'activation du système immunitaire contre les cellules tumorales. (Figure 17) Cette stratégie semble d'autant plus pertinente que la protéine PDL-1 est fréquemment surexprimée (68%) dans les cancers de l'ovaire (Hamanishi et al., 2007). Dans ce cadre, plusieurs molécules sont actuellement en essais cliniques comme le Nivolumab et le Pembrolizumab qui sont des anti-PD1 et l'Avelumab et le Durvalumab qui sont des anti-PDL-1. Ces molécules font actuellement l'objet d'essais cliniques de phases I, II ou III seuls ou en combinaison et pour des cas de cancers chimiosensibles ou chimiorésistants. Les premiers résultats d'un essai clinique de phase I, notamment réalisé avec l'Avelumab en seconde ligne chez des patientes atteintes de cancers ovariens chimioréfractaires et traitées avec de la Doxorubicine a permis de mettre en évidence un taux de réponse de 9,7% et un taux de stabilisation de 44,4%. (NCT01772004) (Pakish et al., 2017)

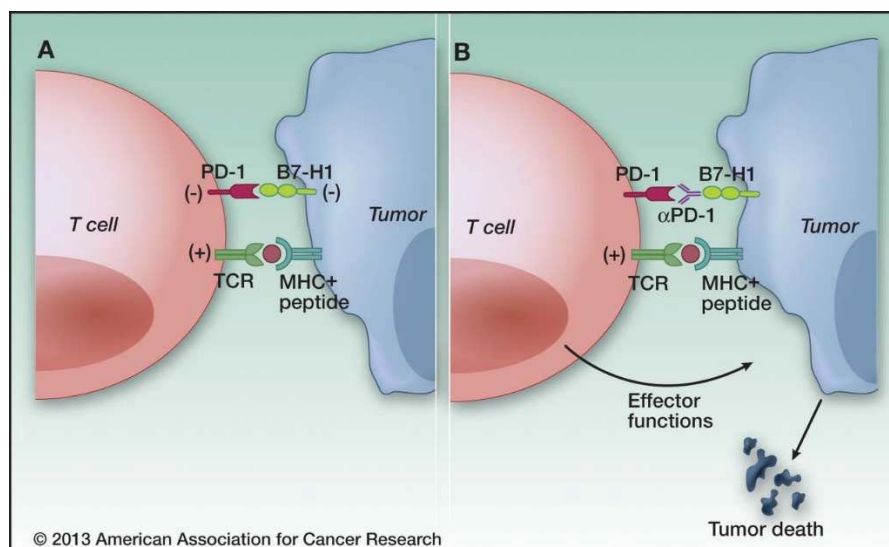


Figure 17 : PD-1 et cancer. (Sznol and Chen, 2013)

Des vaccins sont également à l'étude notamment dirigés contre Her2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) antigène fréquemment exprimé au niveau des cellules cancéreuses ovariennes (Odunsi et al., 2014). L'administration d'un vaccin de cellules dendritiques autologues chargées avec l'antigène Her2/neu chez des patientes en rémission a permis de montrer une survie globale de 90% à 3 ans dans un essai de phase I/II. (Chu et al., 2012) Des vaccins utilisant les cellules tumorales en totalité ont également été synthétisés et provoqueraient une réponse immunitaire plus large impliquant les cellules T cytotoxiques et les cellules T CD4+. Le vaccin Vigil™ administré après la chirurgie et 6 cures de chimiothérapie a déjà permis de montrer une augmentation de l'intervalle de survie sans rechute médian de 604 jours comparé à 377 jours pour le groupe ayant reçu le placebo (NCT01309230). (Oh et al., 2016) Un essai de phase III est en cours (NCT02346747). (Pakish et al., 2017)

Enfin une autre stratégie consiste à injecter des cellules T ayant infiltré la tumeur, préalablement isolées d'une biopsie de la patiente et étendues *ex vivo*. Cette injection, réalisée entre la chirurgie et la première cure de chimiothérapie a permis de montrer une survie globale à 3 ans de 100% par rapport à 67,5% pour les patientes ne l'ayant pas reçu. (Fujita et al., 1995)

Le traitement des cancers de l'ovaire par immunothérapie montre donc des résultats encourageants même si encore aucune molécule n'est actuellement mise sur le marché.

## D. Cibler les dérégulations de la famille Bcl-2 pour restaurer la mort cellulaire par apoptose

### a. La mort cellulaire

Chez les eucaryotes pluricellulaires, au moins une dizaine de types de morts cellulaires est recensée. Parmi celles-ci, on peut trouver par exemple la paraptose, la proptose ou la nécroptose, mais les morts cellulaires les plus décrites à ce jour sont la nécrose, la mort cellulaire induite par l'autophagie et l'apoptose. (Kroemer et al., 2009) (Figure 18)

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle causée par un évènement néfaste comme un traumatisme physique ou une infection. Elle se caractérise par un gonflement des organites conduisant à la perte de l'intégrité membranaire, qui, en provoquant le relargage du contenu cellulaire dans son environnement, induit le déclenchement d'une réponse inflammatoire.

L'autophagie est initialement un processus de survie qui permet à la cellule de recycler ses composés en période de carence. Cependant, si cette période se prolonge, l'autophagie peut conduire à la mort. Au niveau cellulaire, une vacuole au contenu cytoplasmique se forme, puis des protéines s'y agrègent pour permettre la mise en place d'une structure à double membrane : l'autophagosome,



enfin la fusion avec le lysosome va permettre la dégradation de son contenu afin de recycler le matériel cellulaire.

L'apoptose ou mort «cellulaire programmée» est un processus impliqué dans différents phénomènes physiologiques tels que l'embryogenèse ou le développement neurologique et est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Elle se caractérise macroscopiquement par une condensation puis une fragmentation de la chromatine entre les nucléosomes et par une diminution du volume cellulaire. La cellule se détache du tissu et la formation de corps apoptotiques est observable. La membrane plasmique est intacte jusqu'à ce que les phosphatidylsérines passent de la face interne vers la face externe de celle-ci par un mécanisme de flip-flop. Cet acte induit le signal nommé « eat me » qui permet alors aux macrophages de reconnaître et de phagocyter la cellule. (Nunes et al., 2014) (Marino et al., 2013)

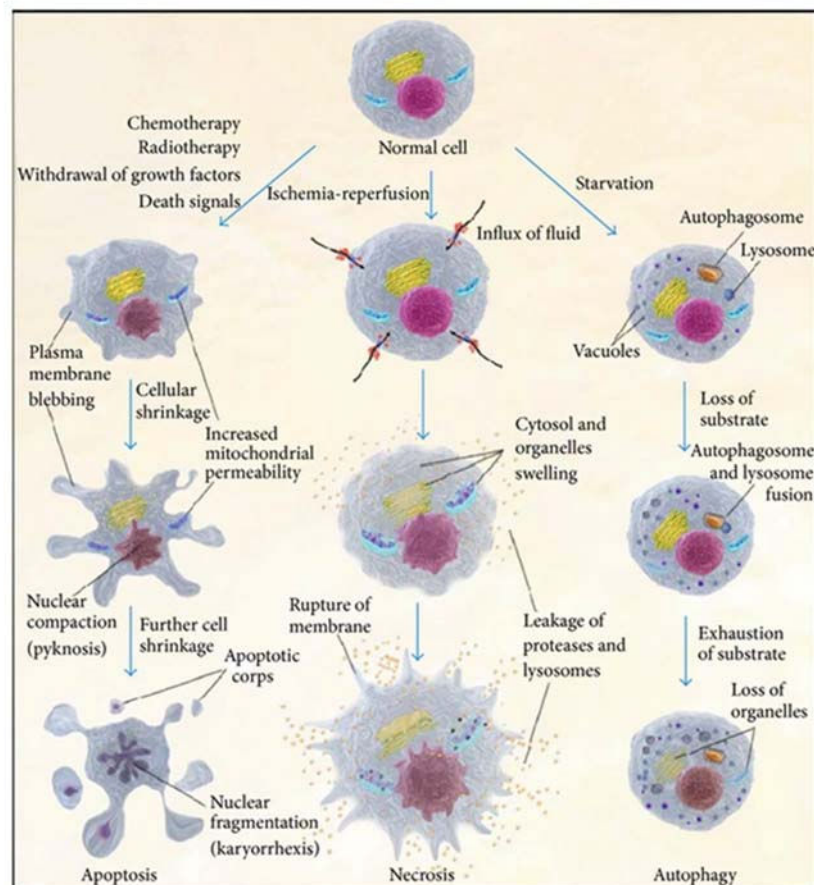


Figure 18 : Les trois voies majeures de la mort cellulaire. (Nunes et al., 2014)

Les cellules peuvent être dirigées vers différents mécanismes de mort cellulaire, dépendant de différents facteurs. A gauche, le processus d'apoptose est représenté avec la rétractation cellulaire caractéristique et la formation de corps apoptotiques sans relargage de leur contenu. Au milieu, la nécrose, processus au cours duquel le cytoplasme et les organites gonflent puis la membrane plasmique se rompt, provoquant le relargage du matériel cellulaire.

A droite, l'autophagie est illustrée avec l'apparition de vacuoles, de l'autophagosome qui fusionne ensuite avec le lysosome, processus qui permet enfin la digestion des organites.

Il a été démontré, dans de nombreuses études, que les cellules cancéreuses peuvent perdre leur capacité à entrer en apoptose, ce phénomène est alors responsable d'une prolifération cellulaire incontrôlée. L'échappement à l'apoptose est aujourd'hui considéré comme une caractéristique majeure des cellules cancéreuses et est responsable de la résistance à la chimiothérapie dans de nombreux modèles. La connaissance des acteurs et des systèmes de régulation de l'apoptose s'avère donc indispensable à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant la restauration de la mort cellulaire. (Hanahan and Weinberg, 2011)

## b. Apoptose, voies extrinsèque et intrinsèque

D'un point de vue moléculaire, deux voies canoniques d'induction de l'apoptose peuvent être mises en jeu : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. (Figure 19)

La voie extrinsèque se caractérise par la liaison de molécules telles que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), Fas ligand et TRAIL (TNF Related apoptosis-inducing ligand) à leurs récepteurs de mort respectifs, TNF-R1, Fas et TRAIL-R1 et R2, qui se trimérisent. Des protéines adaptatrices à domaine de mort ou « Death Domain » (FADD ou encore TRADD) se fixent sur ces récepteurs permettant le recrutement des pro-caspases (Cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases) 8 ou 10. Ces différentes molécules participent à la formation du Death Inducing Signaling Complex (DISC). Les pro-caspases s'auto-activent par clivage et vont alors activer les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7).

Cette voie est régulée négativement par les molécules Flip (FLICE (caspase-8) inhibitory protein) qui inhibent les caspases 8-10 et par les IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) qui bloquent l'activation des caspases 3-7-9. Ces IAP sont elles-mêmes inhibées par la libération de la mitochondrie, de la molécule Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) appelée également Diablo (Direct IAP binding protein and low pI).

La voie intrinsèque est activée par des signaux internes : stress oxydatif, libération importante et prolongée de calcium, ou encore induction de dommages à l'ADN notamment induits par la chimiothérapie, qui vont permettre la libération de cytochrome c, d'AIF (Apoptosis Inducing Factor), d'endonucléase G et de Smac hors de la mitochondrie. La perméabilité membranaire au niveau de cet organite est contrôlée par le port de transition de perméabilité mitochondriale (décrit dans la sous partie « le calcium toolkit ») et par les molécules de la famille Bcl-2 qui en fonction de leur association formeront des canaux qui permettront la sortie de cytochrome c ou au contraire bloqueront ce phénomène.

Le cytochrome c ainsi libéré va permettre l'activation de l'Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), qui, à l'aide du calcium, de l'ATP (Adénosine-5'-TriPhosphate) et de la pro-caspase 9 clivée

en caspase 9 vont former l'apoptosome. Cette structure permet l'activation des caspases effectrices, telles que les caspases 3 qui vont aller dégrader leurs protéines cibles et entraîner la mort cellulaire. (Beesoo et al., 2014)

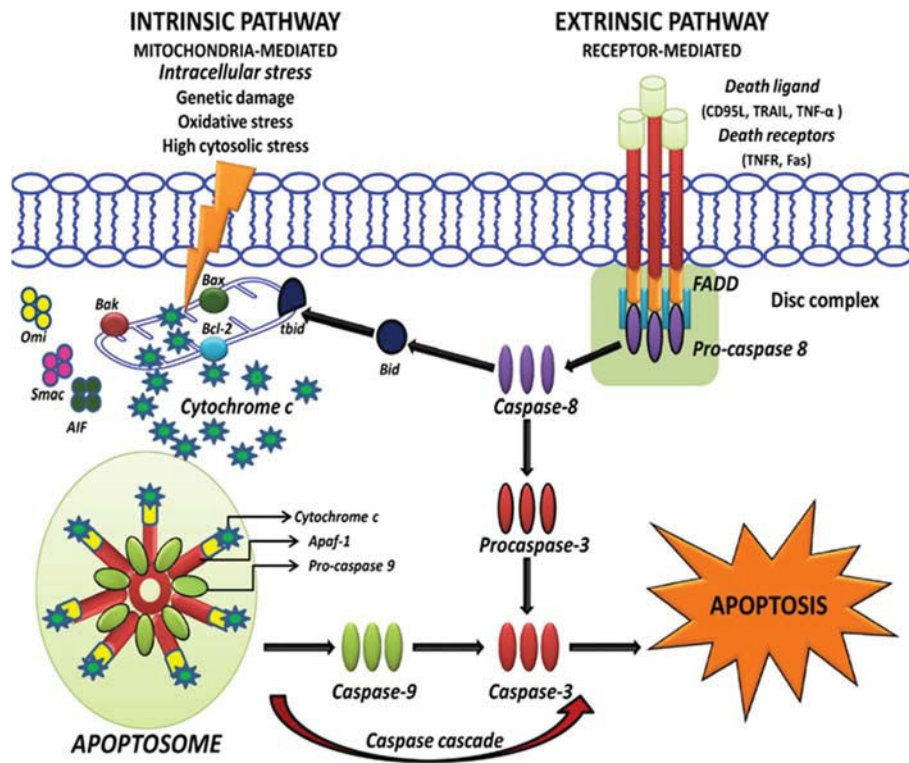


Figure 19 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. (Beesoo et al., 2014)

Ces deux voies d'induction de l'apoptose convergent donc vers l'activation des caspases effectrices. Celles-ci vont activer l'enzyme CAD (Caspase-Activated DNase) en clivant son inhibiteur auquel elle est liée : iCAD. CAD, une fois libérée, peut alors cliver l'ADN entre chaque nucléosome en fragments caractéristiques de 180 paires de bases. L'endonucléase G effectue cette même fonction. (Figure 20)

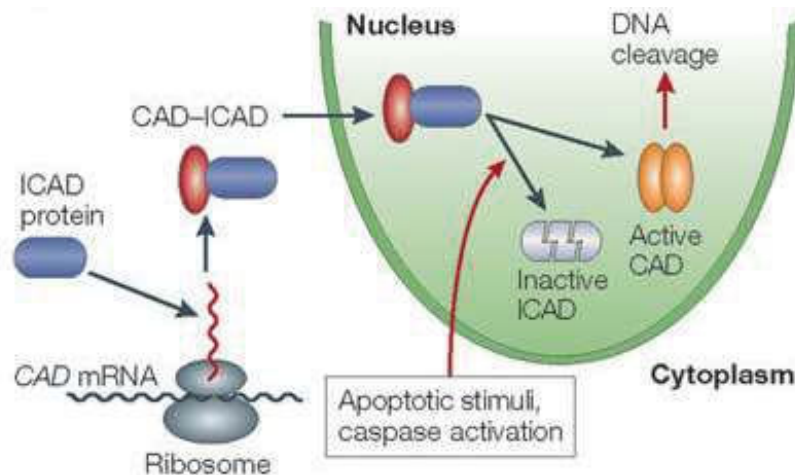


Figure 20 : Mécanisme d'activation de CAD (Samejima and Earnshaw, 2005)

Les molécules de la famille Bcl-2, qui jouent un rôle déterminant dans l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose et dont les dérégulations sont fréquemment observées dans les cancers, représentent des cibles thérapeutiques importantes. (Czabotar et al., 2014)

### c. Membres de la famille Bcl-2

Le gène *BCL-2* a été découvert lors la mise en évidence de son implication dans la translocation (14 ;18) observée dans certains lymphomes, tumeurs au sein desquelles la protéine correspondante est fréquemment surexprimée. La surexpression de Bcl-2 entraîne alors une résistance à la mort cellulaire. (Tsujiimoto et al., 1985) (Miyashita and Reed, 1993) Une vingtaine de molécules présentant une homologie de structure avec Bcl-2 : les domaines BH (de BH1 à BH4), ont ensuite été mises en évidence et toutes ces protéines possèdent en commun le domaine BH3 par lequel se réalisent les interactions [protéines : protéines] entre les membres de cette famille. Ces protéines se subdivisent en trois groupes : les pro-apoptotiques, les anti-apoptotiques multi-domaines et les pro-apoptotiques « BH3-only ».

Les pro-apoptotiques et les anti-apoptotiques multi-domaines sont composés des hélices  $\alpha 1$  à  $\alpha 9$  et possèdent les domaines BH1 à BH4 ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM). Leur structure est globulaire avec au centre un cœur hydrophobe. Ce sillon hydrophobe est délimité par les hélices  $\alpha 2$  à  $\alpha 5$  et constitue l'interface cruciale pour l'interaction avec l'hélice amphipatique du domaine BH3 des autres membres de la famille Bcl-2. (Figure 21)

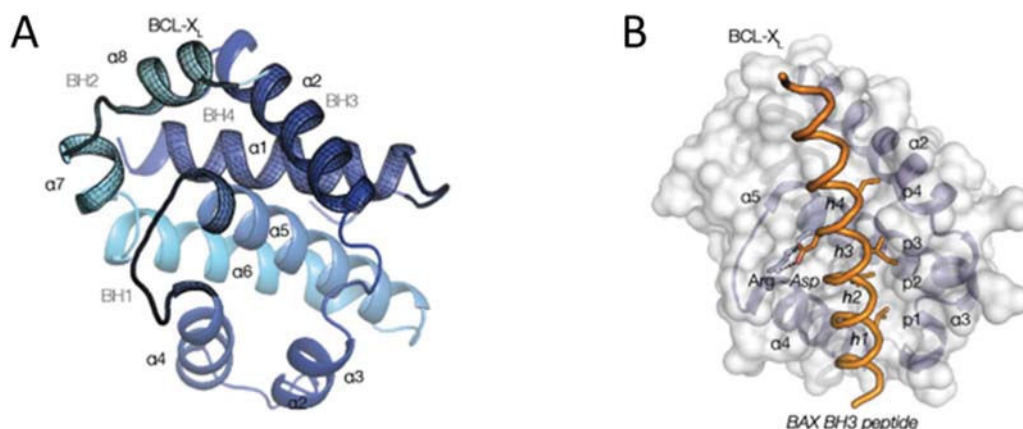


Figure 21 : Structure de Bcl-x<sub>L</sub>. (Birkinshaw and Czabotar, 2017)

A. Bcl-x<sub>L</sub> est représenté avec ses domaines BH quadrillés en noir. Le dégradé de couleur du sombre vers le clair représente l'orientation de la molécule de son extrémité N-terminale vers son extrémité C-terminale. B. Structure cristallisée de Bax (orange) complexé avec Bcl-x<sub>L</sub> (bleu et blanc). La surface de Bcl-x<sub>L</sub> et les hélices  $\alpha 2$ -5 qui englobent le sillon de liaison du domaine BH3 sont représentés. Les résidus clés du domaine BH3 h1-4 ainsi que leurs poches hydrophobes correspondantes p1-4 sont identifiés.

- Les pro-apoptotiques multi-domaines : Bax, Bak, (Bok/MTD) s'oligomérisent au niveau de la mitochondrie pour permettre la formation des canaux nécessaires à la sortie de cytochrome c, d'IAF et d'endonucléase G permettant le déclenchement de l'apoptose.

A l'état basal, Bak est localisé au niveau de la mitochondrie grâce à son domaine de fixation transmembranaire (TM) et Bax est cytosolique. (Edlich et al., 2011) Lorsque le processus apoptotique se met en place, Bax s'accumule à la membrane mitochondriale. Bax et Bak vont alors former des homo- et hétéro-dimères et former un pore. La formation de ce pore implique l'activation des BH3-only qui permet ensuite l'exposition du domaine BH3, la dissociation de l'hélice  $\alpha 1$  et celle des hélices  $\alpha 6-8$  du cœur de la molécule. Les pro-apoptotiques peuvent ainsi s'oligomériser en se liant au domaine BH3 et permettent la sortie de molécules pro-apoptogène de la mitochondrie. (Figure 22)

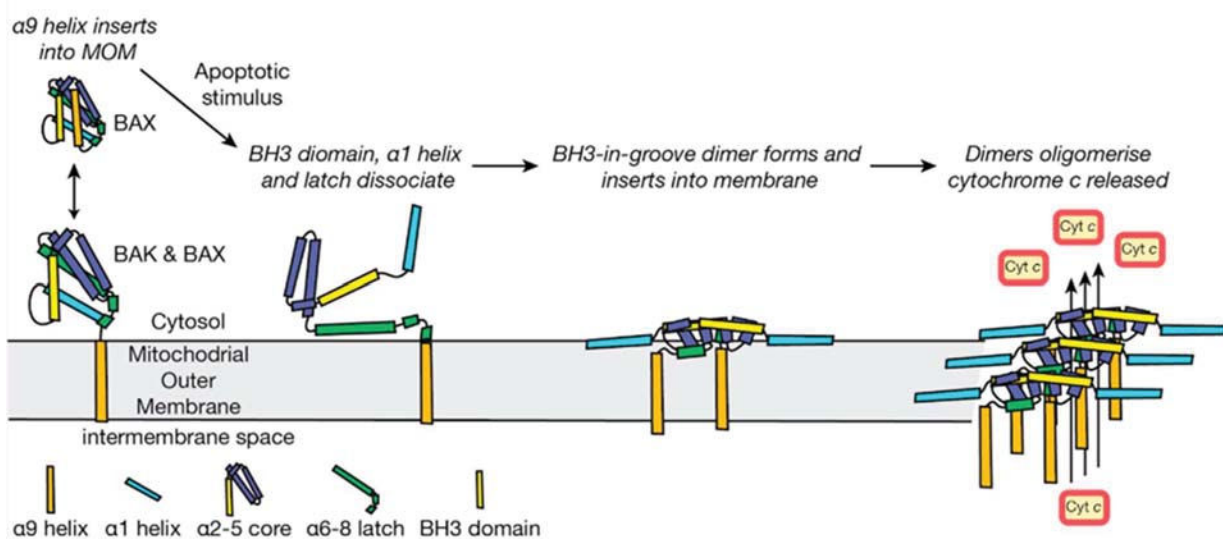


Figure 22 : Changements conformationnels et formation du pore par les protéines pro-apoptotiques multidomaines. (Birkinshaw and Czabotar, 2017)

- Les pro-apoptotiques «BH3-only» eux ne possèdent, comme leur nom l'indique, que le domaine BH3. Ils sont induits de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle par des signaux de stress cellulaire et peuvent être subdivisés en deux sous-groupes :

- les activateurs Bim, Puma et Bid qui sont capables de provoquer le changement conformationnel des protéines multi-domaines et leur activation. Ces protéines peuvent également, comme leurs partenaires « sensibilisateurs » se lier aux membres anti-apoptotiques afin de bloquer leur capacité de séquestration des multi-domaines.

(Il est à noter que Bid possède la particularité d'être activé par la voie extrinsèque de l'apoptose après clivage par la caspase 8, ce mécanisme permet alors d'amplifier l'activation de la voie intrinsèque).

- les sensibilisateurs Bad, Noxa, Bik (ou Blk), Bmf, BNIP3, Hrk (ou DP5), Nix et Spike assurent quant à eux, soit la libération de protéines pro-apoptotiques multi-domaines piégées par leurs homologues anti-apoptotiques, soit le déplacement de protéines BH3-only «activatrices» séquestrées par les membres anti-apoptotiques.

- Les anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-W (Bcl2L2), BFL-1 (ou A1 chez la souris), Bcl-B (Bcl2L10 ou Boo/Diva chez la souris) et Mcl-1 jouent leur rôle en séquestrant les pro-apoptotiques multi-domaines principalement au niveau de la membrane externe mitochondriale. (Juin et al., 2013)

Il existe néanmoins des interactions plus ou moins spécifiques de ces molécules entre-elles. Par exemple, Bad peut lier Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 et Bcl-w alors que Noxa est spécifique de Mcl-1. (Moldoveanu et al., 2014) (Figure 23)

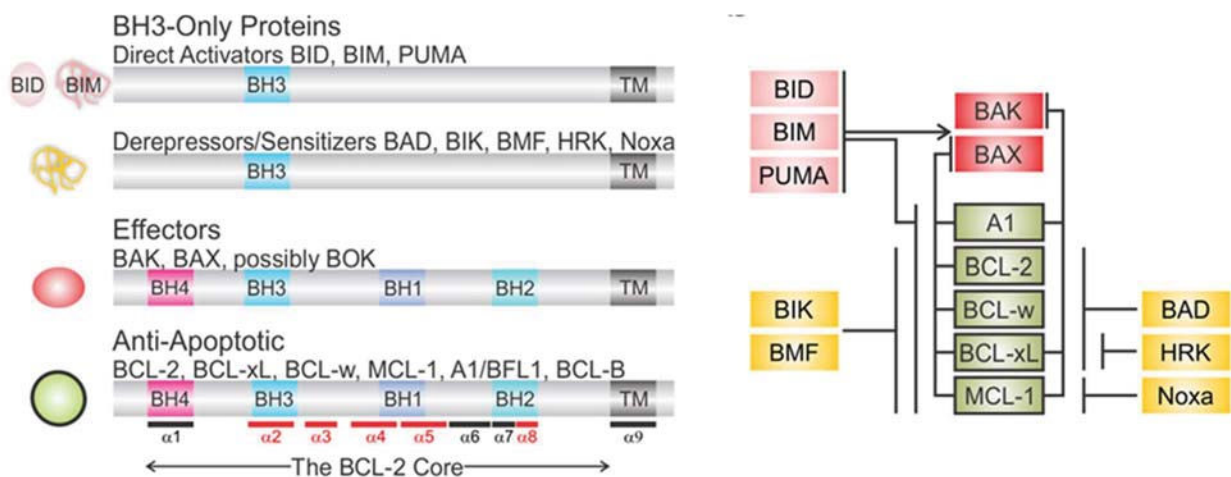


Figure 23 : Structures/fonctions des protéines de la famille Bcl-2. (Moldoveanu et al., 2014)

A. Représentation schématique des protéines de la famille Bcl-2 mettant en évidence les domaines d'homologie BH et le domaine transmembranaire. La position approximative des hélices α est identifiée, celles qui délimitent la poche sont colorées en rouge. B. Interactions fonctionnelles entre les membres pro- et les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Une dérégulation de l'expression de ces molécules en faveur des anti-apoptotiques est souvent observée au niveau des tumeurs cancéreuses, comme par exemple pour des cancers hématologiques ou des tumeurs solides tels les cancers du sein, du poumon, les mélanomes ou encore les mésothéliomes. Cette modification de la balance pro-/anti-apoptotiques perturbe alors le processus apoptotique et peut induire des chimiorésistances (Kang and Reynolds, 2009).

Ainsi, les cellules cancéreuses, qui subissent un stress oncogénique, augmentent la synthèse et l'activation de leurs BH3-only. Cependant la trop grande quantité de molécules anti-apoptotiques empêchera la formation des pores membranaires, en séquestrant les BH3-only ou les pro-apoptotiques multi-domaines. Ce phénomène empêchera alors l'activation et l'oligomérisation de ces derniers. La cellule est dite préparée à la mort ou « primed to death », ce qui signifie que dans ce contexte, l'inhibition des anti-apoptotiques seule suffit à restaurer l'apoptose. (Certo et al., 2006)

#### d. Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 : des cibles thérapeutiques de choix pour traiter les cancers de l'ovaire

Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub> sont des molécules anti-apoptotiques surexprimées dans une grande proportion de cancers. Cette surexpression peut être due à une synthèse protéique plus importante, une moindre dégradation ou à une amplification génique. En effet, après séquençage d'une cohorte de 3131 cancers, il s'est révélé que ces deux molécules anti-apoptotiques faisaient partie des gènes les plus amplifiés. (Beroukhi et al., 2010).

De nombreux arguments montrent que la surexpression de ces protéines constitue un obstacle dans la prise en charge des cancers et que leur inhibition permet de restaurer la sensibilité aux traitements et l'apoptose.

Par exemple, la surexpression protéique de ces deux anti-apoptotiques dans des cellules de cancer colorectal est responsable d'une résistance au traitement à l'oxaliplatine (molécule dérivée du platine). Une inhibition de l'expression de l'un ou l'autre de ces anti-apoptotiques permet d'augmenter l'apoptose induite par cette molécule. (Schulze-Bergkamen et al., 2008)

Par ailleurs, la surexpression de Mcl-1 dans les cellules de myélome multiple est associée à une rechute après traitement et à une survie plus courte. (Wuillème-Toumi et al., 2005)

Il a également été montré que les cellules tumorales ovariennes exprimaient Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 et que leur surexpression était de mauvais pronostic. (Marone et al., 1998) (Villedieu et al., 2007)

Dans ce cadre, une étude sur 28 patientes a mis en évidence que la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> au sein de tissus tumoraux ovariens est associée à la majorité des cas de chimiorésistance. Dans cette même étude, l'induction d'une surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> dans une lignée cellulaire cancéreuse ovarienne initialement chimiosensible permet d'induire une chimiorésistance. (Williams et al., 2005).

Shigemasa et son équipe ont également montré que Mcl-1 était plus fortement exprimé dans les tumeurs ovariennes par rapport aux ovaires sains et que cette forte expression protéique était corrélée à des cancers de grade élevé et était de mauvais pronostic. (Shigemasa et al., 2002).

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de siARN, notre laboratoire a observé, sur des cellules de carcinome ovarien, que la mort cellulaire par apoptose était induite uniquement par

l'inhibition concomitante de Bcl-x<sub>L</sub> et de Mcl-1, alors que l'inhibition d'autres couples d'anti-apoptotiques n'avait pas de conséquence majeure sur la mort cellulaire. (Brotin et al., 2010). L'utilisation concomitante de l'ABT-737 (molécule d'inhibant l'activité de Bcl-x<sub>L</sub> et dont le mode d'action sera détaillé dans la partie BH3-mimétiques) et des sels de platine, qui diminue l'expression de Mcl-1 ou favorise sa dégradation, précipite les cellules vers l'apoptose. (Simonin et al., 2013). Le traitement des cancers de l'ovaire par une combinaison de molécules permettant l'inhibition de ces deux anti-apoptotiques s'avère donc être une stratégie particulièrement intéressante.

- *Structure et régulation de Bcl-x<sub>L</sub>*

Bcl-x<sub>L</sub> possède plusieurs fonctions au sein de la cellule dont la séquestration des proapoptotiques Bax et Bak pour bloquer la formation de canaux nécessaires à la sortie de molécules apoptogènes de la mitochondrie.

Par ailleurs, cette protéine permet également d'inhiber l'autophagie en séquestrant, par fixation à son domaine BH3, l'un de ses principaux inducteurs : Beclin-1, qui a d'ailleurs été par la suite caractérisé comme un BH3-only. (Oberstein et al., 2007) (Maiuri et al., 2007)

Elle exerce également une régulation de la signalisation calcique, notamment en se fixant au niveau des récepteurs à l'inositol triphosphate du RE (Réticulum Endoplasmique). Ces interactions seront développées par la suite. (Michels et al., 2013)

#### Structure de Bcl-x<sub>L</sub> :

Bcl-x<sub>L</sub> est codé par le gène BCL2L1 situé sur le chromosome 20. Un épissage alternatif de l'ARN messenger conduit à la formation de deux protéines différentes, la principale étant Bcl-x<sub>L</sub>, composée de 233 acides aminés. Elle contient quatre domaines BH et le domaine TM nécessaire à sa fixation au niveau des membranes telles que la membrane mitochondriale. (Michels et al., 2013)

#### Régulation de Bcl-x<sub>L</sub> :

Différentes molécules peuvent intervenir dans la régulation de Bcl-x<sub>L</sub>.

Ainsi certaines protéines favorisent la transcription de Bcl-x<sub>L</sub> comme les Interleukines Il-2, Il-3, Il-6, l'érythropoïétine, le Leukemia Inhibitory Factor, le Colony Stimulating Factor ou le Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor. Plusieurs facteurs de transcription sont également connus pour augmenter la synthèse d'ARN messenger de Bcl-x<sub>L</sub>, notamment Re1/NFκB (Nuclear Factor-κB), les STATs (Signals Transducers and Activators of Transcription), Ets et AP-1 (Activator Protein 1). (Sevilla et al., 2001)

Une régulation post-transcriptionnelle de cette molécule anti-apoptotique, *via* le miR-491-5p, a été mise en évidence au laboratoire. (Denoyelle et al., 2014)



Au niveau post-traductionnel, Bcl-x<sub>L</sub> est phosphorylé au niveau de différents résidus sérines, en fonction de la progression dans le cycle cellulaire. Elle est en particulier phosphorylée en Ser<sup>49</sup> par la kinase mitotique Polo-like kinase 3 (PLK3) pendant la phase S, ce phénomène diminuant au début de la mitose en conditions physiologiques. Elle est également phosphorylée en Ser<sup>62</sup> par PLK1 et par la Mitogen-activated Protein Kinase 9 (MAPK9) en réponse à des agents inducteurs de dommages à l'ADN, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle en G2. (Michels et al., 2013)

- *Structure et régulation de Mcl-1*

Mcl-1 est essentiel au développement et à la différenciation des cellules saines. En effet, une délétion de Mcl-1 chez des embryons de souris est létale après implantation. (Rinkenberger et al., 2000) De plus, le développement des lymphocytes B et T, ainsi que la survie de cellules neurales, cardiaques ou sanguines sont des processus qui requièrent la présence de Mcl-1. (Opferman et al., 2003) (Malone et al., 2012) (Wang et al., 2013)

Mcl-1 exerce son action anti-apoptotique en séquestrant principalement Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe, empêchant son oligomérisation et la libération de cytochrome c hors de cet organelle. (Czabotar et al., 2014) (Figure 24)

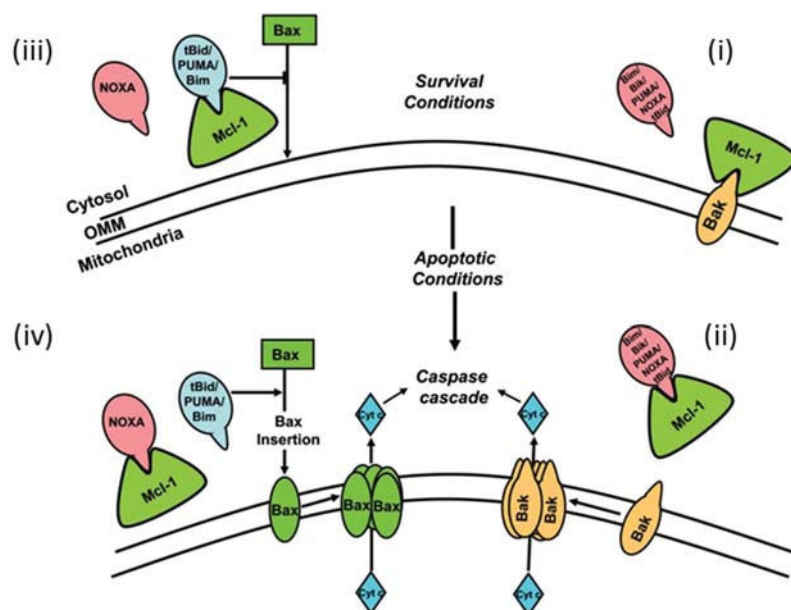
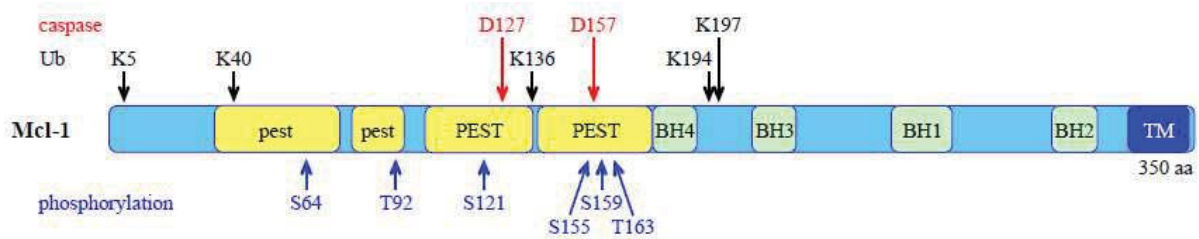


Figure 24 : Mcl-1 joue deux rôles principaux au sein du mécanisme d'apoptose cellulaire (Akgul, 2009).

(i) Dans des conditions de survie, Mcl-1 jouerait la fonction d'un facteur anti-apoptotique en séquestrant Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe. (ii) Cependant, quand des signaux pro-apoptotiques sont reçus, des protéines BH-3 only spécifiques peuvent déplacer Mcl-1 de Bak pour conduire à son oligomérisation et le relargage de cytochrome c hors de la mitochondrie. (iii) Mcl-1 peut également jouer ses fonctions de survie par hétéromérisation avec des protéines BH-3 only activatrices comme tBid, Puma et Bim. (iv) Dans des conditions d'apoptose, Noxa déplace Mcl-1 de ses partenaires activateurs. Puis, Bim, Puma et tBid peuvent interagir avec Bax provoquant son insertion au niveau de la membrane mitochondriale externe, son oligomérisation et le relargage de cytochrome c.

### Structure de Mcl-1 :

Mcl-1 est codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 1 et comporte 3 exons. Trois formes de cette protéine existent issues de l'épissage alternatif de l'ARN messager. Mcl-1<sub>L</sub>, isoforme d'intérêt du fait de sa fonction anti-apoptotique, contient 350 acides aminés, les domaines BH1 à BH4 et le domaine TM en C-terminal. Mcl-1 est très finement régulée et a une demi-vie très courte. Plusieurs séquences riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine, les séquences PEST, localisées en N-terminal, sont responsables de cette importante régulation. Deux résidus, Asp<sup>127</sup> et Asp<sup>157</sup>, sont essentiels au clivage par les caspases. D'autres résidus tels que Ser<sup>64</sup>, Thr<sup>92</sup>, Ser<sup>155</sup>, Thr<sup>163</sup> sont également des sites de phosphorylation de Mcl-1, qui vont soit entraîner sa stabilisation, soit au contraire sa dégradation. (Kobayashi et al., 2007) (Ding et al., 2008) (Figure 25)



**Figure 25 :** Représentation schématique de la protéine Mcl-1 montrant les régions fonctionnelles et les sites de modification post-traductionnelles. (Mojsa et al., 2014)  
Protéine Mcl-1 montrant les régions fonctionnelles et les sites de modifications post-traductionnelles. Celles-ci incluent le domaine transmembranaire (TM), les domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1-4), les faibles (cases en minuscules) et fortes (cases en majuscules) séquences PEST, les sites d'ubiquitination (Ub), de clivage par les caspases et de phosphorylations.

### Régulation de Mcl-1 :

Différents facteurs de croissance sont impliqués dans l'induction de la transcription de Mcl-1 tels que les IL-3, 6, le vascular endothelial growth factor (VEGF) ou l'epidermal growth factor (EGF) faisant intervenir les grandes voies de transduction telles les voies PI3K/AKT et MAP kinases. La transcription de Mcl-1 est régulée par les facteurs de transcription comme par exemple les STATs, ou l'Hypoxia-Inductible Factor-1 (HIF-1) qui protège les cellules de l'apoptose lorsqu'elles sont en hypoxie. (Isomoto et al., 2005) (Wang et al., 2003) (Piret et al., 2005)

Une régulation post-transcriptionnelle est également effectuée. Elle consiste en l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de Mcl-1, ce qui permettra au moment de la traduction, la formation d'une des trois formes de la molécule. (Bingle et al., 2000) En outre, le miRNA-29b se lie au niveau de la séquence 3'-UTR de l'ARNm de Mcl-1 et inhibe sa traduction. (Mott et al., 2007)

L'expression protéique de Mcl-1 est également modulée à ce niveau grâce à l'activation de la voie mTOR et de ses cibles P70S6k et 4-EBP1, régulatrices de la synthèse protéique. (Mills et al., 2008) (Hsieh et al., 2010) (Bhaskar et al., 2009) (Jin et al., 2012).

Enfin, Mcl-1 est régulée de façon post-traductionnelle par différents mécanismes. Cette molécule peut en effet être phosphorylée au niveau de différents acides aminés provoquant soit son activation, soit son inhibition ou sa dégradation. Par exemple, la phosphorylation en Ser<sup>64</sup> augmente sa fonction anti-apoptotique alors qu'une phosphorylation en Ser<sup>121</sup> ou Thr<sup>163</sup> par JNK, en réponse à un stress oxydatif et à la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'inactive. Mcl-1 peut également être stabilisée par sa liaison avec les pro-apoptotiques Bim et Puma, par l'inactivation de GSK-3 et par une phosphorylation par ERK en Thr<sup>92</sup> et Thr<sup>163</sup> qui augmentent sa demi-vie. (Domina et al., 2004) (Maurer et al., 2006) (Inoshita et al., 2002) (Kobayashi et al., 2002)

Mcl-1 peut ensuite être dégradée rapidement grâce à deux voies : la voie des caspases, en particulier la caspase 3 et celle dépendant du protéasome. Ainsi, un clivage de Mcl-1<sub>L</sub> en Asp<sup>127</sup> et Asp<sup>157</sup> par la caspase 3 pendant le processus d'apoptose crée un domaine ayant une activité induisant la mort cellulaire. Une ubiquitylation *via* Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3), ou la liaison de Mcl-1 à Noxa peuvent provoquer sa dégradation au niveau du protéasome. De plus, l'ubiquitination de Mcl-1 par d'autres ubiquitine-ligases telles que les protéines SCF (Skp1-Cullin1-F-Box), APC (Anaphase Promoting Complex) ou Trim 17 (Tripartite motif containing 17) permet également la destruction de Mcl-1 par le protéasome. Cependant, le processus d'ubiquitylation est réversible. En effet, l'USP9X (Ubiquitin specific Peptidase 9X-linked) peut détacher la chaîne d'ubiquitines et entraînera alors la stabilisation de Mcl-1 (Derouet et al., 2004) (Zhong et al., 2005) (Michels et al., 2004) (Mojsa et al., 2014) (Figure 26)

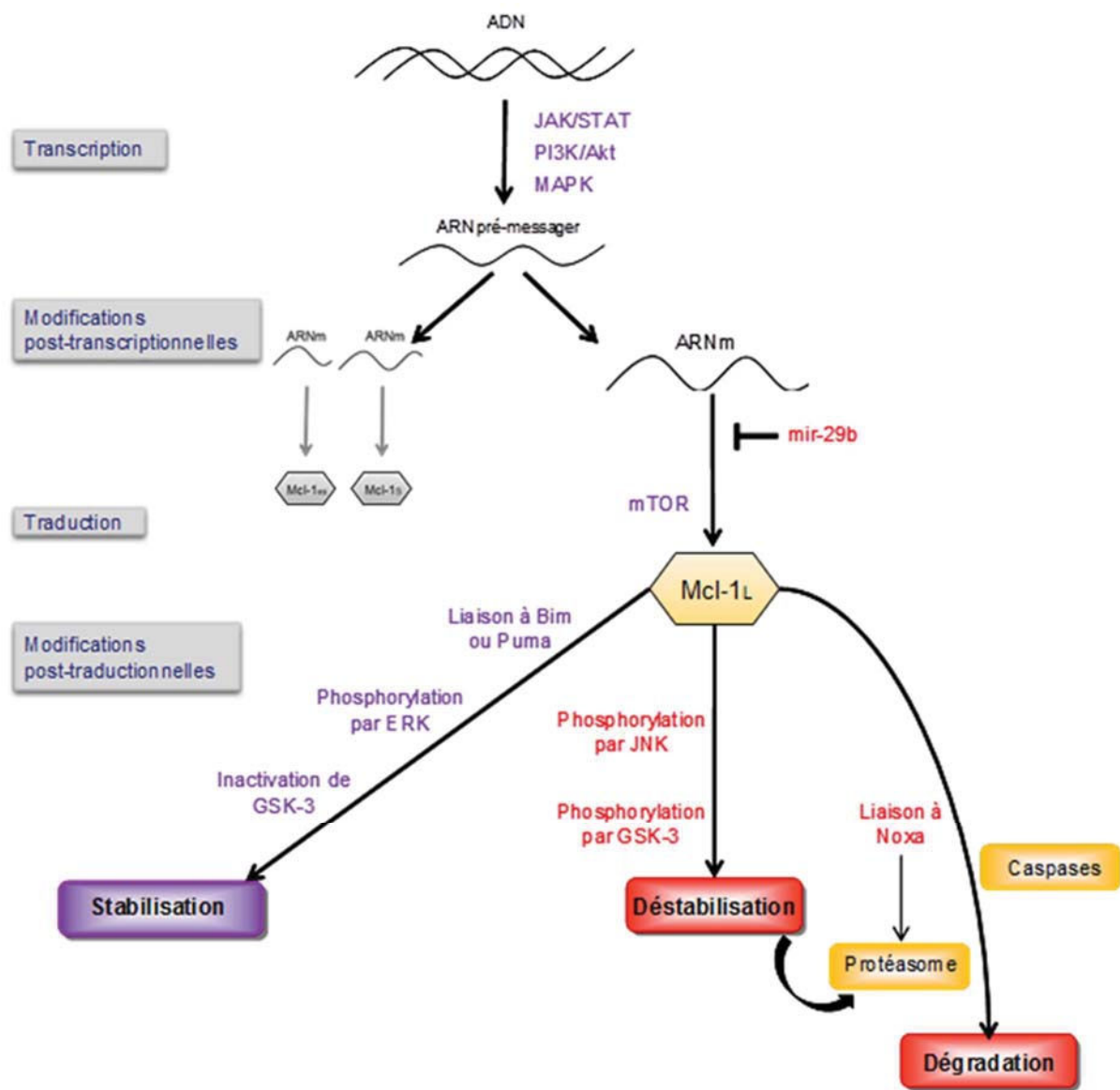


Figure 26 : Principaux modes de régulation de Mcl-1. (D'après Akgul, 2009)

### e. Stratégies d'inhibition de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1

- *Les oligonucléotides anti-sens (OAS)*

Les OAS sont de petites molécules d'ADN simple brin d'une vingtaine de nucléotides synthétisées en laboratoire, ayant pour rôle de se fixer sur les ARN messagers dont la séquence est complémentaire. Les complexes ARN-ADN ainsi formés sont reconnus par la ribonucléase H qui va pouvoir les détruire et ainsi empêcher leur traduction. Ces molécules permettent d'obtenir des résultats intéressants *in vitro*. Une étude montre par exemple que la transfection d'un OAS dans des cellules cancéreuses gastriques inhibe l'expression protéique de Mcl-1, augmente la mort par apoptose et possède une action synergique avec la chimiothérapie au Docetaxel et au Cisplatine. (Wachek et al., 2006) Le

frein principal au développement de ces molécules *in vivo* est leur vectorisation. En effet, elles sont la cible des endonucléases qui vont les dégrader avant même qu'elles ne puissent aller effectuer leur action.

- *Les ARN interférents*

Les ARN interférents regroupent plusieurs types de petites molécules d'ARN : les siARN (small interfering ARN), les miARN (micro ARN), les shARN (short hairpin ARN) ou encore les piARN (Piwi interacting ARN). Parmi eux, les siARN, petites molécules d'ARN double brin exogènes sont d'excellents outils d'inhibition de Mcl-1 *in vitro*. En effet, après avoir été clivé par la RNase Dicer, le siARN devenu simple brin peut se fixer son ARNm cible. Ce dimère va alors être reconnu par le complexe RISC et l'ARNm sera clivé par l'enzyme Ago2. Par la suite, le reste du complexe ainsi que le siARN seront recyclés. L'inhibition de Bcl-x<sub>L</sub> et de Mcl-1 par siARN a montré son efficacité dans de multiples modèles et notamment au niveau de différentes lignées de cellules cancéreuses ovariennes où l'expression protéique est fortement diminuée et suffit pour induire la mort cellulaire. (Brotin et al., 2010)

Les miARN, petits ARN double brin d'origine endogène, peuvent, après clivage par Ago2, cibler différentes molécules d'ARN et ainsi réguler leur expression. L'expression des miARN est fréquemment dérégulée dans les cancers, induisant alors la surexpression de molécules oncogènes ou l'inhibition de molécules dites suppresseurs de tumeurs. Ainsi, l'introduction par transfection du miARN-451 dans des cellules cancéreuses de poumon permet, par exemple, une inhibition de Mcl-1 et une restauration de la sensibilité de ces cellules au cisplatine. (Cheng et al., 2016)

Un autre exemple montre que la transfection du miR-491-5p, permet d'inhiber Bcl-x<sub>L</sub> et de stabiliser Bim *via* l'inhibition des voies contrôlées par l'EGFR, ce qui conduit à l'inhibition de l'activité de Mcl-1, et à la mort dans la lignée cancéreuse ovarienne chimiorésistante IGROV1-R10. (Denoyelle et al., 2014)

Là encore la vectorisation reste l'enjeu majeur pour le développement de ces molécules. C'est d'ailleurs pour cela, qu'à ce jour, les miARN auraient plutôt un avenir en tant que biomarqueurs diagnostiques et/ou prédictifs de la réponse au traitement, dans les cancers. Cet axe de recherche est mis en place au laboratoire.

- *Les BH3-mimétiques :*

Ces petites molécules sont synthétisées à partir du modèle structural de l'hélice alpha des BH3 only, dans le but d'aller se fixer au niveau de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques et ainsi d'empêcher la séquestration des pro-apoptotiques par ces derniers. (Figure 27)

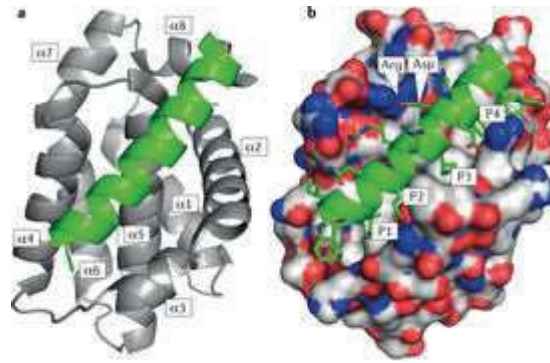


Figure 27 : Fixation d'BH3 mimétique sur un anti-apoptotique (Ashkenazi et al., 2017).

Parmi les BH3-mimétiques développés, il existe différents composés, dits pan-inhibiteurs, c'est-à-dire capables de cibler les différents anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1.

Parmi eux voici quelques exemples : (Figure 28)

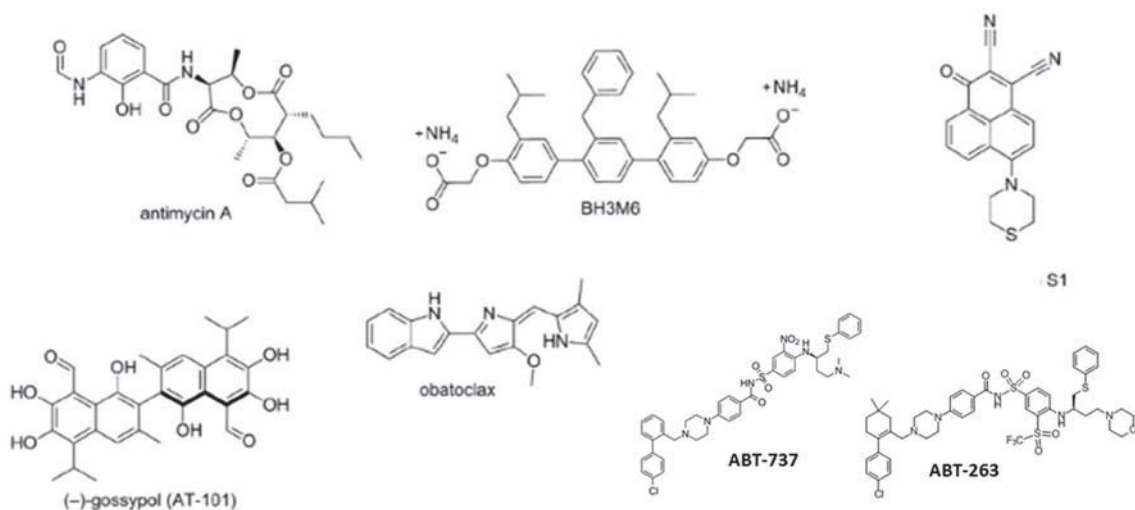


Figure 28 Structures chimiques de BH3 mimétiques pan-inhibiteurs

- **l'antimycine A**, antibiotique isolé de *Streptomyces* sp., est capable de se lier de façon compétitive et à des concentrations équivalentes à Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>.
- **le BH3M6**, empêche les liaisons de Mcl-1 avec Bak dans les cellules HE1299 et de Bcl-x<sub>L</sub> et Bax dans les cellules A549 et également la liaison de Bim avec Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 et Mcl-1 dans les cellules MDA-MB468. (Kazi et al., 2011) (Beekman and Howell, 2016).
- **Le composé S1**, caractérisé par sa capacité à déplacer Bid de Bcl-2 empêche aussi la liaison de Mcl-1 avec Bak. Cependant, le fait qu'il induise également l'expression de Noxa, partenaire préférentiel de Mcl-1, pourrait remettre en question l'inhibition directe de la liaison Bak-Mcl-1. Une étude préclinique montre que ce composé est capable de retarder la



Cette molécule a montré une efficacité importante en agent seul sur de nombreuses lignées cellulaires de leucémies et de lymphome notamment ainsi qu'en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques dans des lignées cancéreuses hématologiques et tumeurs du sein par exemple. (Konopleva et al., 2006) (High et al., 2010) (Oakes et al., 2012) Une mauvaise solubilité aqueuse et biodisponibilité ont limité le développement de l'ABT-737 en clinique. Un dérivé administrable par voie orale de cette molécule a alors été développé : l'ABT-263 (Navitoclax) et est aujourd'hui en essais cliniques de phases I et II dans de nombreux cancers. (Opydo-Chanek et al., 2017) Une étude clinique de phase II de cette molécule utilisée en agent seul est d'ailleurs en cours au centre de lutte contre le cancer François Baclesse pour le traitement des cancers de l'ovaire chimioréfractaires/chimiorésistants (MONAVI-1). En effet, le laboratoire a montré sur 25 patientes que dans le cas où Bim est fortement exprimé et p-ERK et Mcl-1 faiblement exprimés, il pourrait avoir une action cytotoxique utilisé en agent seul (Lheureux et al., 2015). L'administration de l'ABT-263 provoquant cependant des thrombopénies, une autre molécule, l'ABT-199 (Vénétoclax) a été synthétisée. Cependant, elle est 1000 fois plus affine pour Bcl-2 que pour Bcl-x<sub>L</sub>. Elle est en développement pour les cancers hématopoïétiques qui surexpriment Bcl-2 et fait l'objet de nombreux essais cliniques notamment de phase III. C'est la première molécule BH3 mimétique qui a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques, en seconde ligne. Il a d'ailleurs reçu une autorisation temporaire d'utilisation en France dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques. (Vandenberg and Cory, 2013) (Birkinshaw and Czabotar, 2017).

D'autres BH3-mimétiques inhibiteurs spécifiques de Bcl-x<sub>L</sub> comme le WEHI-539, l'A-1155463 et l'A-1331852 ont été synthétisés et sont aujourd'hui en développement pré-clinique. (Ashkenazi et al., 2017). (Tableau 4)



Tableau 4 : Caractéristiques de petites molécules qui ciblent les membres de la famille Bcl-2 (Ashkenazi et al., 2017).

Compound	Targets	Affinity
<b>BCL-2 inhibitors</b>		
ABT-737	BCL-2, BCL-X <sub>L</sub> and BCL-W	Subnanomolar to nanomolar
Navitoclax (also known as ABT-263)	BCL-2, BCL-X <sub>L</sub> and BCL-W	Subnanomolar to nanomolar
BM-1197	BCL-2 and BCL-X <sub>L</sub>	Subnanomolar
S44563	BCL-2 and BCL-X <sub>L</sub>	Nanomolar
BCL2-32	BCL-2 and BCL-X <sub>L</sub>	Nanomolar
AZD4320	BCL-2 and BCL-X <sub>L</sub>	≤1 nM
Venetoclax (also known as ABT-199)	BCL-2	Subnanomolar
S55746 (also known as BCL201)	BCL-2	Nanomolar
<b>BCL-X<sub>L</sub> inhibitors</b>		
WEHI-539	BCL-X <sub>L</sub>	Subnanomolar
A-1155463	BCL-X <sub>L</sub>	Subnanomolar
A-1331852	BCL-X <sub>L</sub>	Subnanomolar
<b>MCL1 inhibitors</b>		
UMI-77	MCL1	Nanomolar
Compound 9	MCL1	Nanomolar
A-1210477	MCL1	Subnanomolar
Compound 34	MCL1	Nanomolar
S63845	MCL1	Subnanomolar
AMG176	MCL1	Nanomolar

Plusieurs BH3-mimétiques ciblant spécifiquement Mcl-1 sont aujourd'hui en développement. Cependant, les différentes caractéristiques physico-chimiques de cette molécule rendent ce travail complexe. En effet le sillon de Mcl-1 est plus électropositif et plus hydrophobe que celui des autres anti-apoptotiques, mais il est surtout superficiel et plus rigide. La position en surface de ce sillon permet de plus nombreux accrochages et décrochages de ses ligands et la rigidité implique la création de molécules ayant la structure la plus adaptée possible à celle-ci. (Day et al., 2005) (Quinn et al., 2011) (Billard, 2012).

L'ensemble de ces caractéristiques représente un challenge dans le design de BH3-mimétiques.

Parmi eux (Figure 30) :

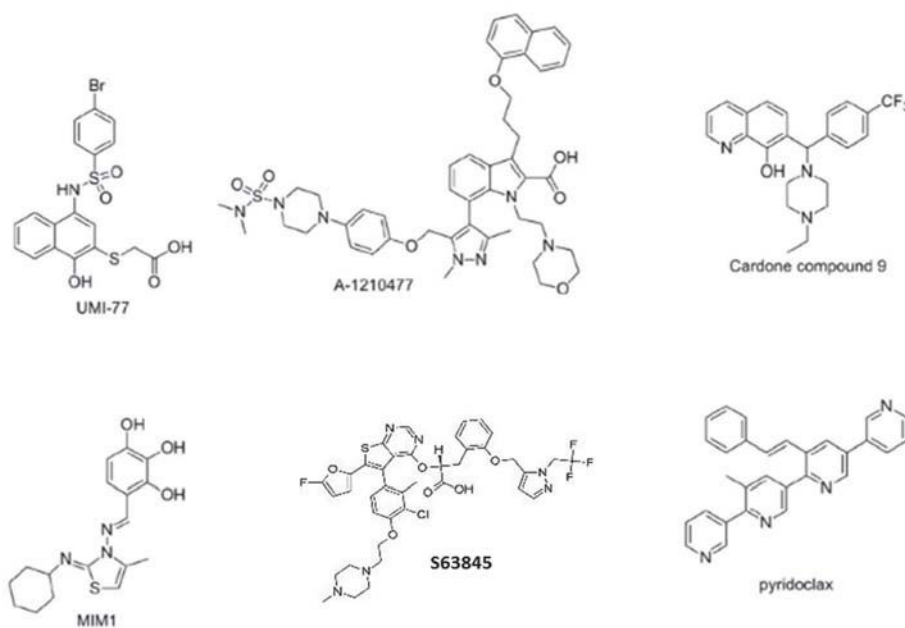


Figure 30 : Structures chimiques de BH3 mimétiques ciblant spécifiquement Mcl-1

- **l'UMI-77**, malgré une faible affinité pour Mcl-1, ce composé est capable de bloquer l'hétérodimérisation de Mcl-1 avec Bak et également d'induire l'apoptose à des concentrations de l'ordre du micromolaire dans la lignée de cellules pancréatiques BxPC-3. Deux cycles de traitement en intraveineuse avec l'UMI-77 sur un modèle de xéno greffe de ces mêmes cellules ont permis de mettre en évidence une légère régression tumorale. (Abulwerdi et al., 2014)
- **L'A1210477** perturbe l'interaction entre Mcl-1 et Bim et induit la mort de cellules de myélome multiple et de cancer du poumon à non petites cellules. De façon intéressante, il peut avoir un rôle synergique en combinaison avec l'ABT-263 dans des lignées cellulaires de cancer du pancréas, du poumon, ou de myélome multiple. (Leverson et al., 2015). Cependant, la mauvaise pharmacocinétique de cette molécule compromet son développement *in vivo* et limite aujourd'hui son utilité à un composé d'étude. (Opferman, 2016)
- **L'EU-5346 (compound 9)** est également un composé qui empêche la liaison de Bim avec Mcl-1 et qui permet d'induire l'apoptose de diverses cellules cancéreuses. (Richard et al., 2013) Ce dernier reste également pour l'heure un composé d'étude.
- **MIM1** a lui montré sa capacité à induire l'apoptose dans des modèles cellulaires leucémiques dépendants de Mcl-1. La petite taille de cette molécule et le fait qu'elle ne cible qu'une partie du domaine BH3 de Mcl-1 semblent être des freins à son développement clinique (Beekman and Howell, 2016).
- **Le S63845**, a montré son efficacité *in vitro* à des concentrations très faibles sur des cellules de myélome multiple. De plus, *in vivo*, une régression tumorale est observée après 5 jours de traitement consécutif sur un modèle de tumeurs humaines de leucémies myéloïdes aiguës xéno greffées et une rémission complète a lieu après 80 jours sur 6 des 8 souris. Ce composé a également été testé sur des lignées cellulaires issues de tumeurs cancéreuses solides, en combinaison avec diverses molécules anticancéreuses telles que le tramétinib (inhibiteur de la voie de signalisation MEK) ou le PLX-4032 (inhibiteur de B-Raf) ; ces combinaisons ont un effet cytotoxique (Kotschy et al., 2016).
- **Le Pyridoclax**, (MR29072), oligopyridine (molécule formée d'une succession de pyridines) sur laquelle sont greffés des résidus mimant des composés de l'hélice  $\alpha$  du domaine BH3, a été conçu grâce à la collaboration du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) et de l'unité INSERM U1086 Anticipo. Cette molécule est capable de sensibiliser des lignées de cellules cancéreuses ovariennes, de poumon et de mésothéliome aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub>, à une concentration optimale de 25  $\mu$ M. (Gloaguen et al., 2015)

Cette molécule fait aujourd'hui l'objet d'études *in vivo* dans le laboratoire (Thèse de Siham HEDIR).

L'ABT-737 et l'ABT-263 s'avèrent être des molécules intéressantes pour bloquer l'activité de Bcl-x<sub>L</sub>, y compris en clinique.

Plusieurs molécules permettent également d'inhiber Mcl-1 de façon efficace *in vitro*. Cependant, à ce jour, le développement de la plupart d'entre elles n'est pas encore assez avancé pour une utilisation en clinique. Par ailleurs, les résultats des études cliniques concernant l'AT-101 et l'Obatoclax se révèlent être relativement décevants. Il est donc nécessaire, de trouver d'autres stratégies pour inhiber Mcl-1.

- *Inhiber les voies de signalisation intervenant dans l'expression de Mcl-1*

Cibler les voies de signalisation intervenant dans la régulation de Mcl-1 est également une stratégie envisageable dans la mesure où cette molécule est extrêmement finement régulée par plusieurs d'entre-elles, de sa transcription à sa dégradation.

- **La voie MAPK/ERK**

Il est connu que l'activation de la voie MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular signal-regulated kinase) est capable d'augmenter la transcription et la stabilité de Mcl-1, il paraît alors pertinent d'inhiber cette voie de signalisation.

Structure et acteurs de la voie MAPK/ERK :

La voie MAPK/ERK est une voie de signalisation appartenant à la famille des MAPK. Les voies de cette famille sont activées par la fixation d'un ligand à son récepteur à tyrosine kinase (RTK). Ces RTK s'autodimérisent et s'autophosphorylent entre-eux, ce qui permet l'activation par phosphorylation d'au moins trois kinases en cascade, des MAPKKK aux MAPK, aboutissant à l'activation de nombreuses protéines ayant un rôle dans les grands processus cellulaires tels que la prolifération ou l'apoptose.(Figure 31)

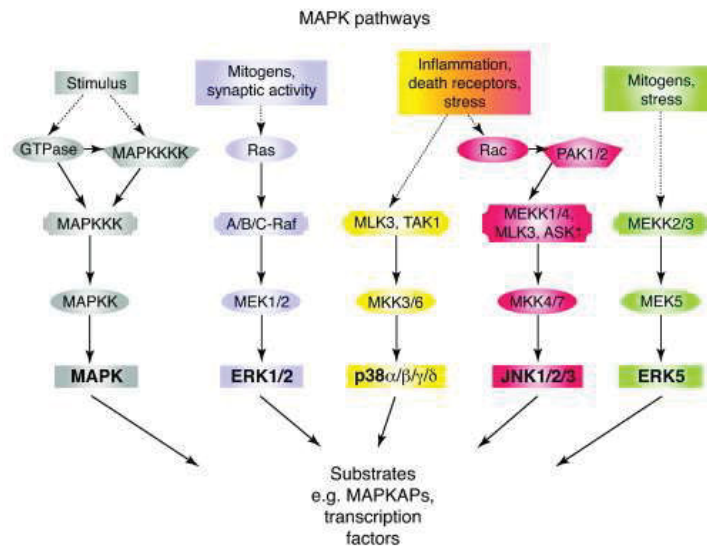


Figure 31 : Composants clés des quatre voies majeures des MAPK. (Berwick and Harvey, 2011)

Ainsi, la voie MAK/ERK, permet le recrutement de la GTPase Ras (Rat Sarcoma) (MAPKKKK), puis la phosphorylation de RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) (MAPKKK), MEK (MAPK/ERK Kinase) (MAPKK), et enfin ERK (MAPK) qui engage alors la phosphorylation de nombreuses protéines entrant en jeu dans la prolifération cellulaire telles que c-myc, Elk-1 (ETS domain containing 1), FOXO3a (Forkhead box O3) ou RSK (90 KDa Ribosomal S6 Kinase) nécessaires et la transcription ou/et à la traduction (Akinleye et al., 2013) (Cargnello and Roux, 2011) (Uehling and Harris, 2015) (Figure 32)

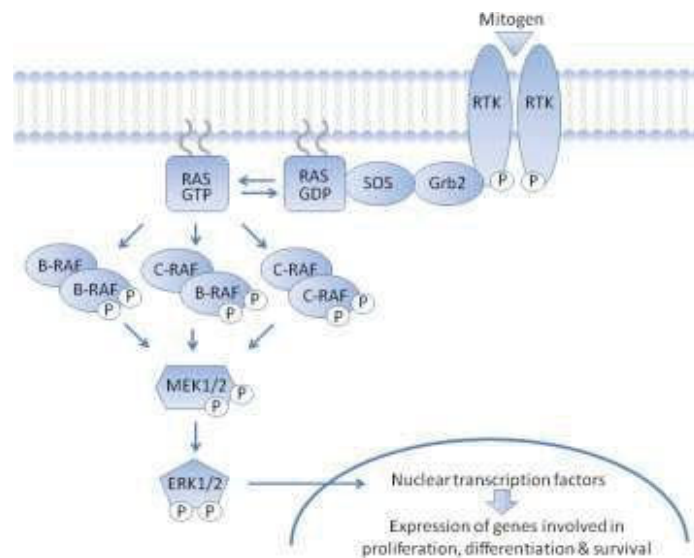


Figure 32 : Schéma Représentation schématique de la voie MAPK et de deux de ses inhibiteurs. (adapté de Uehling and Harris, 2015)

La voie MAPK/ERK est activée par la fixation d'un ligand à son récepteur RTK. Ceci provoque le recrutement des protéines adaptatrices Grb2 au niveau du domaine SH2 des RTK puis des protéines SOS1/SOS2 (Son Of Sevenless) (facteurs d'échange de nucléotide guanine) qui permettent le recrutement de la GTPase RAS. Celle-ci recrute et active à son tour B-RAF et C-RAF. Ces dernières s'homo ou s'hétérodimérisent puis phosphorylent MEK1/2. Enfin MEK1/2 phosphoryle ERK qui permet alors la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la prolifération cellulaire.

### Dérégulations dans les cancers de l'ovaire :

Cette voie est mutée en KRAS (codant pour une des protéines GTPase de la famille Ras) dans 14% dans cancers de l'ovaire, mais seulement dans moins de 1% des cancers séreux de haut grade. Par ailleurs, B-RAF et C-RAF (codant pour des protéines de la famille RAF) sont également mutées respectivement dans 11% et 4% des cancers de l'ovaire mais ces mutations ne sont retrouvées dans le sous-type histologique séreux de haut grade que dans 0,5% des cas. (Santarpia et al., 2012) Enfin MAPK et ERK ne sont quasiment jamais mutées dans les cancers séreux de haut grade. Néanmoins une autre kinase, MAP3K8, connue notamment pour réguler p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinases), peut également activer MEK indépendamment de la voie en amont et serait surexprimée dans 50% des cancers de ce sous-type histologique. (Gruosso et al., 2015). Cette surexpression permettrait d'ailleurs un échappement au traitement par un inhibiteur de B-RAF en réactivant la voie en aval. (Johannessen et al., 2010)

### Inhibiteurs de la voie MAPK/ERK :

Il existe de nombreuses molécules inhibitrices de cette voie de signalisation. Parmi elles, le Tipifamib, capable d'inhiber l'ancrage de Ras à la membrane, empêchant alors son activation, est en essai clinique de phase I/II/ et III dans le traitement de nombreux cancers. (Epling-Burnette and Loughran, 2010)

Le Sorafenib inhibiteur multi-kinases, est identifié comme inhibiteur de Raf et est déjà en clinique dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires, rénaux et le cancer de la thyroïde. Le Vemurafenib, plus spécifique, a montré sa capacité à inhiber l'isoforme B-Raf mutée : B-Raf<sup>V600E</sup> et est en clinique dans le traitement du mélanome. Ce sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP. (Maik-Rachline and Seger, 2016) (Samatar and Poulikakos, 2014)

Le Selumetinib, le Trametinib, le Pimasertib, et le PD032591, inhibiteurs de MEK sont en essais cliniques. Ils agissent en se fixant sur un site allostérique voisin du site de liaison à l'ATP. (Burotto et al., 2014)

Enfin, l'inhibition de ERK est possible grâce au SCH900353 qui inhibe à la fois sa phosphorylation par MEK et son activité kinase ou grâce au BVD-523 en essais cliniques également. (Samatar and Poulikakos, 2014)

Parmi ces inhibiteurs, le Sorafenib, le Selumetinib, le PD032591 et le Pimasertib sont en essais cliniques dans les cancers de l'ovaire.

### Inhiber la voie MAPK/ERK pour inhiber Mcl-1 :

Plusieurs études ont mis en évidence que cette voie de signalisation pouvait contrôler l'expression de Mcl-1. Par exemple, il a été montré que l'inhibition de RAF par le Sorafenib est capable de réduire

l'expression de Mcl-1 *in vitro* sur des lignées cellulaires de leucémies lymphoïdes chroniques et d'induire la mort cellulaire (Fecteau et al., 2012a)

L'inhibition de MEK par le PD032591 dans des cellules de leucémies myéloïdes aiguës a également permis de mettre en évidence l'inhibition de Mcl-1 et d'induire la mort cellulaire en combinaison avec l'ABT-737. (Konopleva et al., 2012a)

Enfin, l'inhibition de Mcl-1 par le Selumetinib a été observée dans des cellules cancéreuses colorectales mutées au niveau de *B-Raf* ou *K-Ras* et dans des cellules de leucémie myéloïde aiguë. (Sale and Cook, 2013) (Zhang et al., 2014)

- **La voie PI3K/Akt/mTOR**

Une autre voie de signalisation paraît extrêmement pertinente à cibler pour inhiber Mcl-1 au niveau traductionnel : la voie PI3K/Akt/mTOR. (Hsieh et al., 2010) (Mills et al., 2008) (Bhaskar et al., 2009) (Jin et al., 2012) (Figure 33)

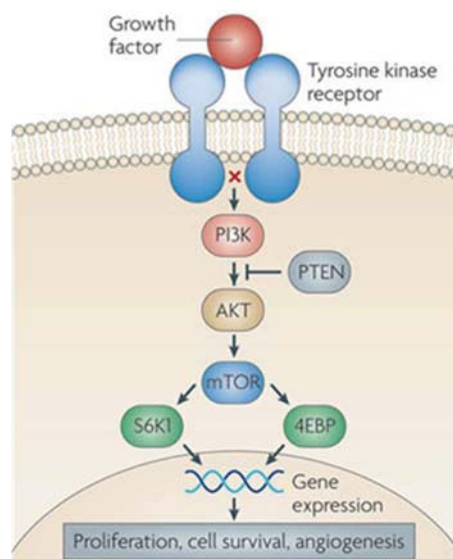


Figure 33 : Schéma simplifié de la voie PI3K/Akt/mTOR. (Holmes, 2011)

Structure et acteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR :

Cette voie de signalisation est activée après fixation d'un ligand sur son récepteur RTK ou sur son récepteur couplé à une protéine G (RCPG) et fait intervenir 3 acteurs majeurs :

- Les PI3K (phosphoinositide 3-kinase) : ce sont des enzymes à activité lipide-kinase. Il en existe 3 classes PI3KI, PI3KII et PI3KIII.

Les PI3KII et PI3KIII, dont le mode d'action reste encore assez peu décrit, ont pour substrat principal le phosphatidylinositol membranaire qu'elles phosphorylent en

phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). La PI3KIII est impliquée dans le processus d'autophagie, en phosphorylant le phosphatidylinositol en PIP3 nécessaire à la mise en place du phagosome. (ce phénomène sera explicité dans la partie «Calcium et autophagie») (Liu et al., 2009)

Les PI3K de classe I se séparent en deux classes, les PI3K de classes IA et IB. Les RTK vont permettre l'activation des PI3K de classe IA, composées d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110 (dont il existe trois isoformes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ ) alors que les RCPG vont permettre l'activation des PI3K de classe IB, composées d'une sous-unité 101 et d'une sous-unité 110 ( $\gamma$ ). Ces PI3K vont phosphoryler principalement le phosphatidylinostol 4-5 bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinostol 3-4-5 trisphosphate (PIP3). (Vanhaesebroeck et al., 2012) (Figure 34)

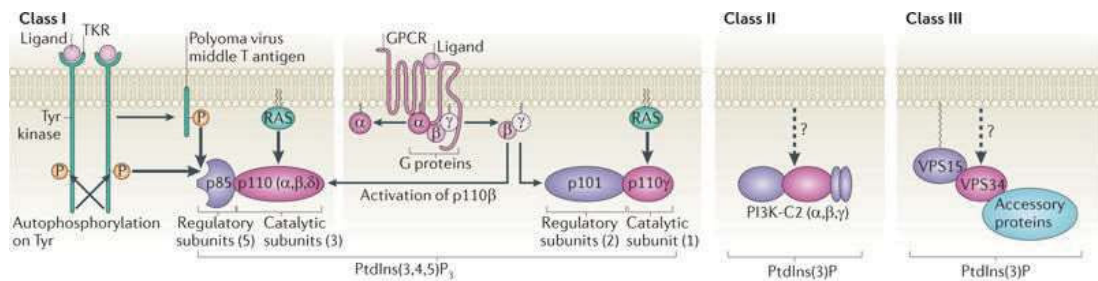


Figure 34 : Les trois classes de PI3K (Vanhaesebroeck et al., 2012)

- Akt (Protein kinase B) : cette protéine située en aval de la PI3K, est une kinase possédant trois isoformes Akt1 (ubiquitaire), Akt2 (localisée dans les tissus sensibles à l'insuline) et Akt3 (retrouvée dans le cerveau et les testicules). Ces protéines sont composées d'un domaine d'homologie pleckstrin en N-terminal, d'un domaine à activité kinase central et d'un domaine régulateur en C-terminal, également appelé domaine hydrophobe. (Figure 35)

Cette enzyme phosphoryle de multiples cibles et est impliquée dans la majorité des fonctions de la cellule comme la prolifération, la croissance cellulaire, la survie, le métabolisme et également dans la cancérogénèse. Le PIP3 généré par la PI3K interagit avec Akt *via* son domaine d'homologie pleckstrin et recrute cette kinase à la membrane sous sa forme inactive. Ce phénomène induit un changement conformationnel d'Akt ce qui permet sa phosphorylation activatrice au niveau de deux résidus que sont la Thr<sup>308</sup> au niveau du site catalytique et la ser<sup>473</sup> au niveau du domaine C-terminal pour Akt1. La phosphorylation d'Akt en Thr<sup>308</sup> est effectuée par la 3-phosphoinoside-dépendant kinase 1 (PDK1) et la phosphorylation en ser<sup>473</sup> est réalisée par le mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2). (Osorio-Fuentealba and Klip, 2015) (Figure 36)

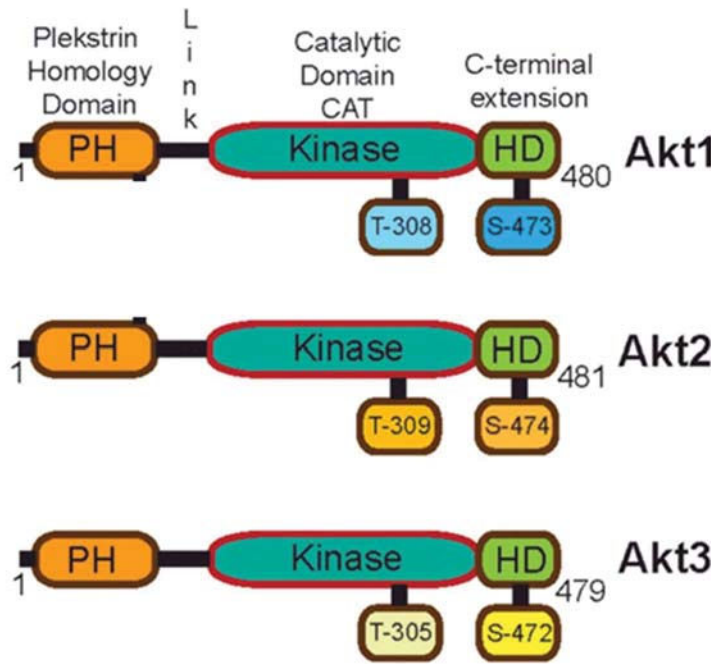
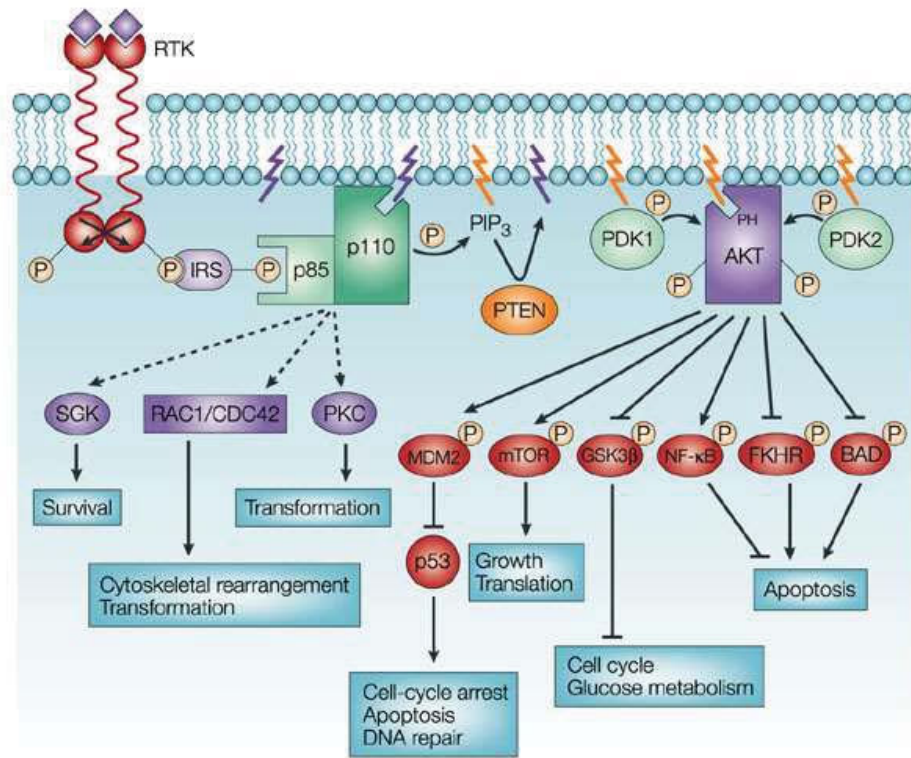


Figure 35 : Représentation schématiques des différentes isoformes d'Akt. (adapté d'Osorio-Fuentealba et al., 2015)



Nature Reviews | Cancer

Figure 36 : Akt, une kinase impliquée dans les grands processus cellulaires (vivanco et al., 2002)



mTORC1 et mTORC2 : ces deux complexes multi-protéines sont composés d'une kinase centrale : mTOR de la protéine deceptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) inhibitrice de ces complexes, de mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) dont la fonction reste inconnue mais qui semble indispensable à l'activation de mTORC2, et des protéines tti1 et tel2 impliquées dans l'assemblage et la stabilité des complexes. Les autres protéines sont spécifiques de chacun des complexes et leur permet d'avoir des substrats et des modes de régulations différents. (Laplante and Sabatini, 2012) (Figure 37)

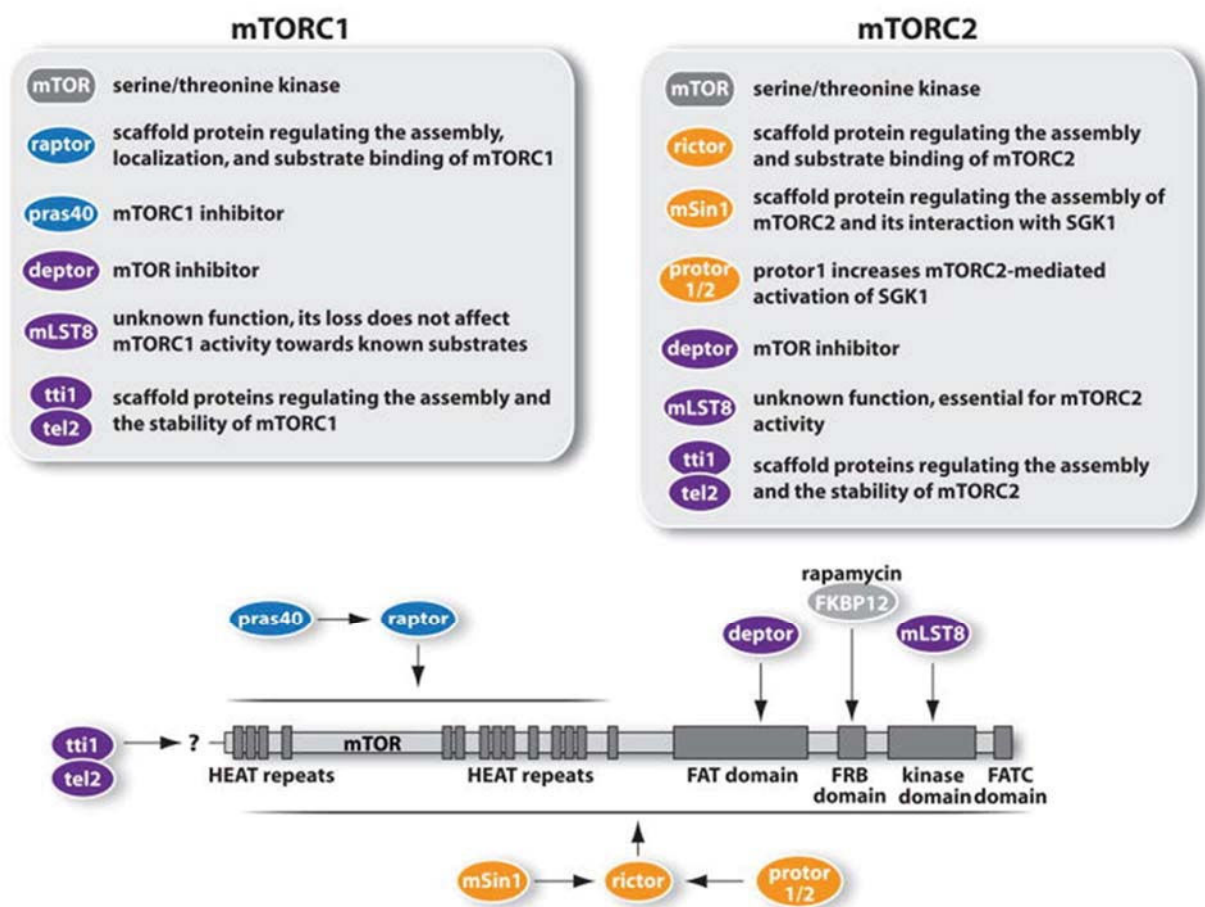


Figure 37 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2. (Laplante et Sabatini 2012)

- mTORC1 comprend les protéines Raptor impliquée dans la spécificité de substrat de mTORC1 et pras40, inhibitrice de ce complexe. Ce complexe est activé par Akt qui phosphoryle mTOR en ser<sup>2448</sup>. Une fois actif, il permet l'inhibition de l'autophagie et la mise en place de processus tels que la synthèse lipidique et la synthèse protéique. Afin d'activer la synthèse protéique, il permet la phosphorylation du facteur ribosomal de régulation de la traduction S6K1/P70S6K (S6 kinase-1) et du facteur de régulation de la traduction 4EBP1 (4E

Binding Protein 1). Ce dernier, une fois phosphorylé, va libérer le facteur de traduction eIF4E impliqué dans la formation du complexe eIF4F, nécessaire à l'initiation de la traduction protéique dépendante de la coiffe. La kinase P70S6K, elle, phosphoryle notamment S6, impliquée dans la traduction ribosomale. A la différence de mTORC2, mTORC1 est sensible à l'action de la rapamycine, qui, en se fixant à la protéine FK506-Binding Protein 12 kDa forme un complexe qui interagit directement et inhibe mTORC1.

- mTORC2, est composé spécifiquement de mSin1 (mammalian Stress-activated map kinase-interacting protein 1), protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) impliqués notamment dans l'interaction et l'activation de SGK1 (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1, qui contrôle le transport ionique et qui est impliquée dans la croissance et dans la réponse au stress cellulaire) et de Rictor (Rapamcin-insensitive companion mTOR), permettant la spécificité de substrat et de liaison de mTORC2. Ce complexe, moins bien décrit que mTORC1, serait impliqué dans la survie cellulaire, le métabolisme et dans l'organisation du cytosquelette. Il semble être activé par la PI3K en réponse des facteurs de croissant tels que l'insuline par un mécanisme peu décrit et activerait à son tour, SGK1, la protéine kinase C $\alpha$  ou encore Akt. La phosphorylation d'Akt en ser<sup>473</sup> permet alors à cette kinase d'atteindre son état d'activation maximal. (Laplante and Sabatini, 2012) (Figure 38)

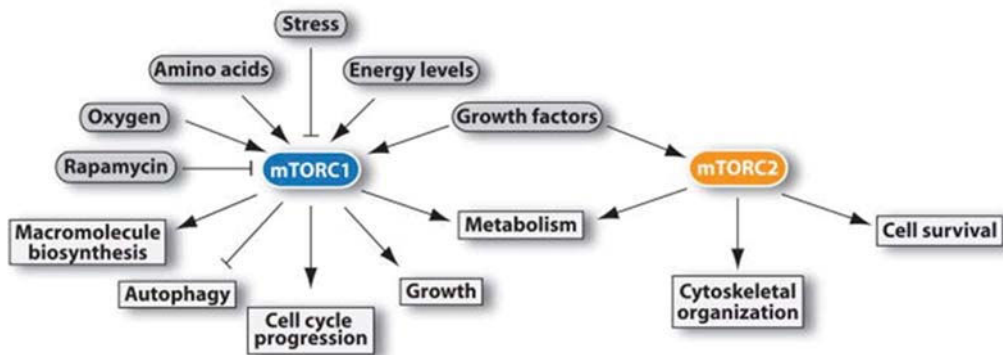


Figure 38 : Activation de mTORC1 et mTORC2 et implication dans les grands mécanismes cellulaires. (Laplante et Sabatini 2012)

L'activation de cette voie commence par la fixation d'un ligand à son récepteur (RCPG ou RTK). L'activation du récepteur permet la fixation directe de la PI3K de classe A ou indirecte par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme IRS1 (Insulin Receptor Substrat 1). L'activation de la PI3K permet la phosphorylation du PIP2 en PIP3. Ce dernier composé va permettre le recrutement d'Akt et de PDK1 à la membrane, permettant alors le changement de conformation d'Akt puis sa

phosphorylation en Thr<sup>308</sup> par PDK1. PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) peut, à ce stade, empêcher ce recrutement en déphosphorylant le PIP3 en PIP2.

Une fois activée, Akt va soit activer directement le complexe mTORC1 en phosphorylant mTOR en Ser<sup>2448</sup>, soit effectuer une phosphorylation inactivatrice de TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), inhibant alors le complexe TSC1/TSC2. Ce complexe, lorsqu'il est actif permet la conversion de Rheb (Ras homolog enriched in brain)-GTP en Rheb-GDP responsable de l'inactivation de mTORC1.

mTORC1 une fois activé, phosphoryle S6K1/P70S6K et 4EBP1 permettant la traduction protéique et mTORC2 est activé par PI3K et permet la phosphorylation d'Akt en ser<sup>473</sup> afin qu'elle atteigne son état d'activation maximal. (Laplante and Sabatini, 2012) (Mabuchi et al., 2015)

Il existe plusieurs boucles de rétro-contrôles de cette voie. Parmi elles :

- p-P70S6K est capable d'inhiber le recrutement de la PI3K, notamment en permettant la destruction de la protéine adaptatrice au récepteur IRS1, et donc la voie de signalisation en aval, ce qui aboutit à la diminution de la phosphorylation d'Akt en Thr<sup>308</sup>.
- p-P70S6K peut également inhiber mTORC2, ce qui aura pour conséquence d'empêcher la phosphorylation d'Akt en ser<sup>473</sup>. (Julien et al., 2010) (Figure 39)

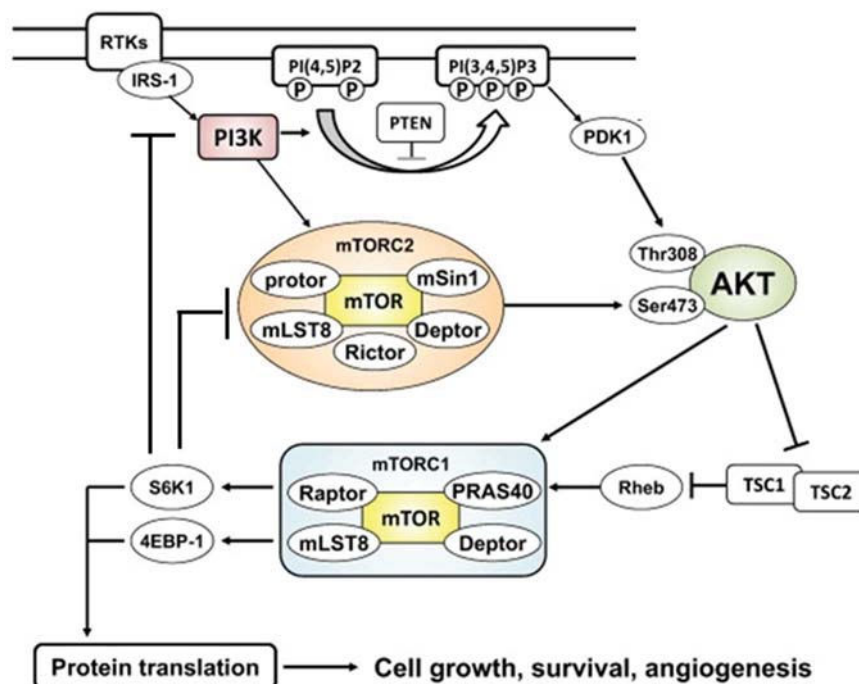


Figure 39 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. (adapté de (Mabuchi et al., 2015)

#### Dérégulations dans les cancers de l'ovaire :

Cette voie est très fréquemment dérégulée dans les cancers, ce qui conduit à une augmentation de la croissance tumorale. Ainsi, des mutations activatrices du gène *PI3KA* sont retrouvées dans 12% des

cancers de l'ovaire et une amplification de *Akt2* dans 13,3%. Par ailleurs, des analyses immunohistochimiques ont montré que cette voie est activée dans environ 50% de ces cancers sévères de haut grade (Mabuchi et al., 2015) (Figure 40)

Gene	Genetic alteration	Cancer type	Incidence of alterations
<i>PTEN</i>	Mutation	Ovarian cancer	9.8%
<i>INPP4B</i>	Loss of heterozygosity	Ovarian cancer	39.8%
<i>PIK3CA</i>	Mutation	Ovarian cancer	12%
	Mutation	Ovarian Clear Cell Carcinoma	46%
<i>PIK3R1</i>	Mutation	Ovarian cancer	3.8%
<i>AKT1</i>	Mutation	Ovarian cancer	2%
<i>AKT2</i>	Amplification	Ovarian cancer	13.3%
<i>mTOR</i>	Mutation	Ovarian cancer	1.9%

Figure 40 : Incidence des altérations génétiques de la voie PI3K/Akt/mTOR (Mabuchi et al., 2015)

#### Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR :

Cette voie peut être inhibée à différents niveaux présentés ci-dessous.

- Les inhibiteurs de PI3K :
  - Les pan-inhibiteurs de PI3K de classe I : Ils ont pour avantage d'inhiber toutes les PI3K de cette classe, afin d'éviter des phénomènes de rétrocontrôles. Aujourd'hui, deux molécules font l'objet d'essais cliniques le NVP-BKM120 et le XL 147 dans les cancers de l'ovaire. Leur efficacité est cependant à ce jour limitée du fait d'une toxicité importante nécessitant de les utiliser à des doses ne permettant pas d'avoir un effet suffisant. Cette toxicité est due notamment à des effets hors-cibles et également potentiellement à un effet toxique lié à l'inhibition simultanée de toutes les PI3K. (Brachmann et al., 2012)
  - Les inhibiteurs de PI3K sélectifs d'une isoforme : Ils permettent d'inhiber une PI3K spécifique et doivent être alors utilisés en fonction des altérations de la tumeur. Parmi les molécules inhibitrices sélectives des PI3K, deux molécules qui permettent l'inhibition de l'isoforme p110 $\alpha$ , le BYL-719 et le GDC-0032 sont aujourd'hui en essais cliniques dans les cancers de l'ovaire.

- Les inhibiteurs d'Akt :

Parmi les différents inhibiteurs de cette molécule, la Perifosine (KRX-0401) et le MK-2206 sont en essais cliniques dans les cancers de l'ovaire. La Perifosine est un analogue du phosphatidylinositol, qui en se fixant sur Akt, empêche sa translocation à la membrane et le MK-2206 est un inhibiteur allostérique des formes d'Akt1 et Akt2 (Mabuchi et al., 2015)

- Les inhibiteurs de mTOR :

- Les Rapalogues :

Ces molécules, dont le chef de file est la Rapamycine, sont capables d'inhiber l'activité sérine/thréonine kinase de mTORC1. Parmi elles l'Everolimus et le Temsirolimus sont utilisés en clinique dans le traitement de cancers. Ces deux molécules ainsi que la Rapamycine et le Ridaforolimus sont actuellement en essais cliniques dans le traitement des cancers de l'ovaire.

Cependant l'effet de ces molécules n'est que partiel sur mTORC1 car elles n'inhibent pas complètement la phosphorylation de 4EBP1. De plus, elles n'inhibent pas le complexe mTORC2 ni les boucles de rétrocontrôle. Ainsi P70S6K n'étant plus phosphorylé par mTORC1, elle ne permettra plus la dégradation d'IRS1 au niveau du récepteur. PI3K restera alors activée et continuera de phosphoryler Akt en Thr<sup>308</sup>. Par ailleurs, P70S6k n'effectuera plus la régulation de mTORC2. Ce dernier continuera alors de phosphoryler Akt en Ser<sup>473</sup>. (Laplante and Sabatini, 2012)

- Les asTORIS (active-site mTOR inhibitors) :

Ce sont des inhibiteurs compétitifs du site actif pour l'ATP qui inhibent à la fois mTORC1 et mTORC2. De plus, ils inhibent de façon plus complète la phosphorylation de 4EBP1. Dans cette classe, deux molécules sont actuellement en essais cliniques pour le traitement des cancers de l'ovaire : l'INK128 et l'AZD2014. (Laplante and Sabatini, 2012)

- Les doubles inhibiteurs PI3K/mTOR :

Ce sont également des inhibiteurs compétitifs du site actif pour l'ATP, mais ceux-ci ciblent en plus des deux complexes mTOR, les PI3K de classe I, ce site actif étant similaire pour ces différents composés. Cette double inhibition doit permettre d'inhiber la voie de signalisation de façon plus complète en évitant la réactivation de la PI3K par la levée des rétrocontrôles négatifs de mTORC1. Une seule molécule de cette classe est aujourd'hui en essais cliniques pour le traitement du cancer de l'ovaire : le PF04691502 (Laplante and Sabatini, 2012)

#### Inhiber la voie PI3K/Akt/mTOR pour cibler Mcl-1 :

Il est bien démontré que mTOR et ses cibles 4-EBP1 et P70S6K sont impliquées dans la traduction de Mcl-1. En effet, 4-EBP1 séquestre le facteur d'initiation de la traduction eIF4E empêchant sa fixation à l'ARN ; la phosphorylation de 4-EBP1 par mTORC1 provoque alors la libération de eIF4E qui est

responsable de la traduction de Mcl-1 (Mills et al., 2008) Dans ce contexte, il a par exemple été montré qu'une hyperactivation de mTORC1 conduisait à une expression soutenue de Mcl-1 et que la réduction des niveaux d'eIF4E inhibait l'expression protéique de Mcl-1 dans des cellule TSC2 -/-. (Bhaskar et al., 2009).

Hsieh, lui, a créé un modèle de souris transgéniques possédant une activation constitutive d'Akt. L'analyse des thymocytes de ces souris met en évidence une augmentation de la phosphorylation de rpS6 (ribosomal protein S6) et de 4EBP1 et de la traduction de Mcl-1 par rapport aux lymphocytes de souris ne possédant pas cette hyperactivation. Il crée par la suite des individus possédant en plus une forme de 4EBP1 mutée (rendant sa phosphorylation impossible) et met alors en évidence un taux plus faible de Mcl-1 que dans les thymocytes possédant uniquement l'hyperactivation d'Akt, démontrant l'implication de cette voie dans la traduction de Mcl-1. (Hsieh et al., 2010).

Par ailleurs, Jin et son équipe ont montré que l'inhibition de P70S6K provoque également l'inhibition de l'expression protéique de Mcl-1 dans des cellules H1299. (Jin et al., 2012)

Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré l'efficacité de l'inhibition de Mcl-1 par la voie PI3K/Akt/m-TOR.

Tout d'abord, il a été mis en évidence que le MK-2206 inhibe Mcl-1 dans des lignées cellulaires de carcinome broncho-pulmonaire et pancréatique.(Somnay et al., 2013).

Il a également été montré que l'inhibition de mTORC1 par l'Everolimus entraîne l'inhibition de Mcl-1 dans les lignées cancéreuses ovariennes SKOV3 et OVCAR5 et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et conduit à la mort cellulaire. (Guo et al., 2016)

Par ailleurs, une étude menée au laboratoire a également mis en exergue que le traitement des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes IGROV1-R10 et SKOV3 avec un analogue de l'AZD2014, l'AZD8055, permet d'inhiber Mcl-1 et sensibilise partiellement les cellules à l'ABT-737. (Pétigny-Lechartier et al., 2017) Preuss a également montré que la combinaison de l'AZD8055, en inhibant Mcl-1, avec l'ABT-737 permet d'induire l'apoptose dans des cellules de rhabdomyosarcome, comme Faber qui a combiné l'AZD8055 avec l'ABT-263 dans des cellules de cancers colorectales. (Preuss et al., 2013) (Faber et al., 2014)

Enfin d'autres travaux menés au laboratoire ont montré que l'utilisation du NVP-BEZ-235 a un effet cytostatique et est capable d'inhiber Mcl-1 dans les cellules cancéreuses ovariennes IGROV1-R10 et SKOV3. (Jebahi et al., 2014). Cependant, la toxicité majeure de cette molécule a conduit à un arrêt des essais cliniques en cours. (Figure 41)

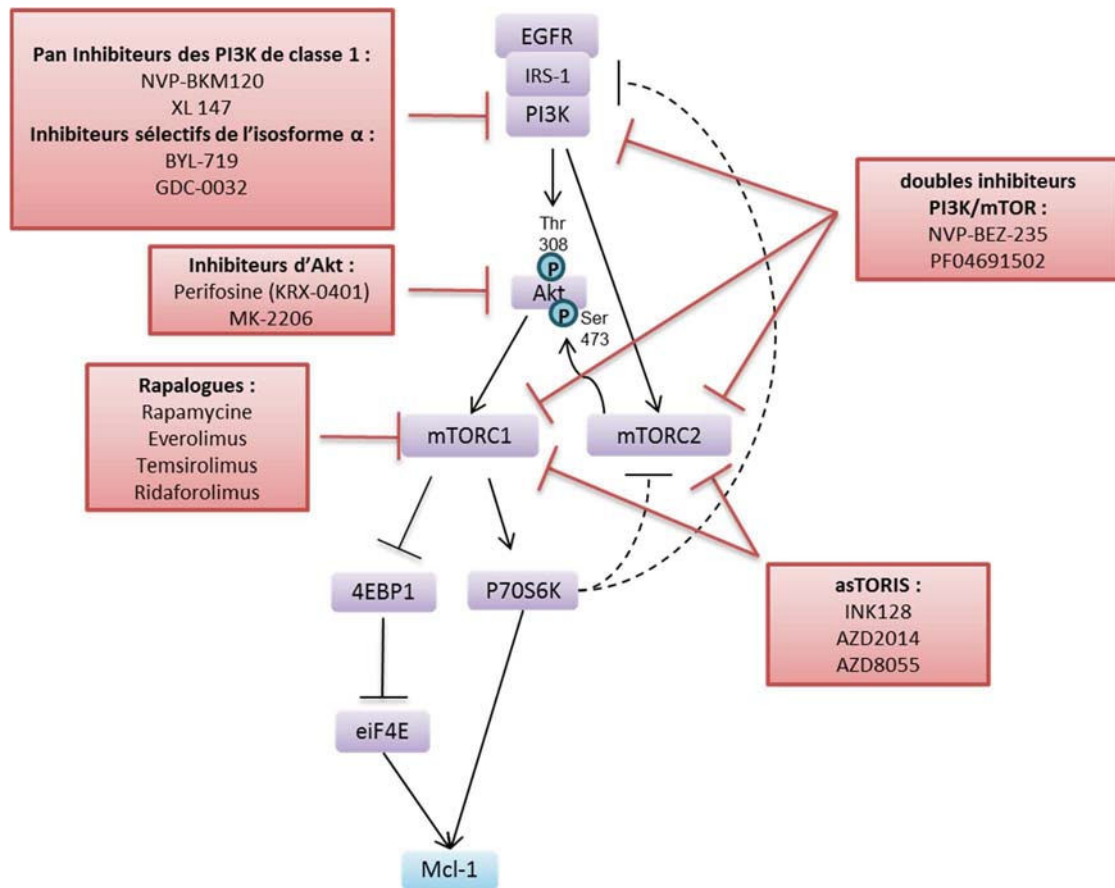


Figure 41 : Représentation schématique de la voie PI3K/Akt/mTOR et de ses différentes classes d'inhibiteurs pharmacologiques.

Mcl-1 est une protéine régulée au niveau de sa transcription par les voies PI3K/Akt et MAPK/ERK, au niveau traductionnel par la voie PI3K/Akt/mTOR et au niveau post-traductionnel par ERK. De plus, inhiber ces voies de signalisation pour inhiber Mcl-1 est une stratégie qui a déjà fait ses preuves dans de nombreux modèles. L'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR, en particulier, semble efficace pour inhiber Mcl-1 dans les cellules cancéreuses ovariennes, voie activée dans environ la moitié des cancers ovariens séreux de haut grade.

Afin d'éviter les inconvénients des molécules inhibitrices d'une voie de signalisation, dont les effets pouvaient être limités par l'activation de rétrocontrôles induisant l'activation d'autres voies de compensation, nous nous sommes tournés vers des molécules à plus large spectre : les inhibiteurs des flux calciques. En effet, de nombreuses dérégulations des flux calciques ont été observées dans les cancers et notamment dans les cancers de l'ovaire. De plus, des inhibiteurs des flux calciques ont été décrits comme capables d'inhiber les voies de signalisation MAPK/ERK et mTOR dans différents modèles. Par ailleurs, quelques études montrent déjà qu'il est possible de moduler Mcl-1 *via* la modulation du calcium.

### III. La modulation des flux calciques : une stratégie thérapeutique pertinente

Le calcium est un ion essentiel à la plupart des processus cellulaires. Sa concentration cytoplasmique libre est finement régulée par des pompes, des canaux et des échangeurs. Ceux-ci permettront l'entrée ou la sortie de calcium de la cellule, ainsi que sa capture et son relargage au niveau de différents organites cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), principal réservoir intracellulaire de calcium, les mitochondries, l'appareil de Golgi et les lysosomes. La concentration extérieure de calcium est supérieure à 1 mM, alors que la concentration cytoplasmique libre en l'absence de stimulation n'est que de 100 nM. Par ailleurs, le RE a une capacité de stockage de 0,1 mM.

Lorsqu'un stimulus active l'entrée du calcium dans le cytoplasme, soit par l'entrée de calcium dans la cellule, soit par le relargage d'un compartiment extracellulaire, la concentration augmente pour atteindre une valeur allant jusqu'à 1  $\mu$ M ce qui entraîne l'activation de nombreux processus cellulaires dépendants de cet ion. A la suite de cette stimulation, le taux basal de calcium est restauré sauf si un processus de mort est mis en place (Berridge et al., 2000).

Les variations de calcium cytoplasmique sont dues à l'activation de pompes, de canaux et d'échangeurs. Ils permettent le passage du calcium de l'extérieur à l'intérieur de la cellule et inversement, et d'un compartiment cellulaire à l'autre. Des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire tels que les RTK et les RGPG peuvent également activer les PLC (phospholipases C) qui pourront activer certains canaux. Ces différents acteurs composent le « calcium toolkit ».

Une fois dans le cytoplasme, le calcium est pris en charge par des protéines qui ont un pouvoir tampon : les protéines à domaine EF-hand comme la calmoduline ou les protéines S100. Celles-ci activent alors de nombreuses protéines comme les calmodulines kinases et la calmoduline kinase II. D'autres protéines comme les PKC (protéine kinase C) requièrent également du calcium pour fonctionner. L'activation de ces différentes molécules va permettre d'activer de nombreuses voies de signalisation et de moduler le devenir cellulaire.

Les principaux composants du calcium toolkit seront ainsi passés en revue, ainsi que les protéines qui tamponnent cet ion et les protéines effectrices du calcium.



# 1. Les acteurs de la signalisation calcique

## A. Les canaux, pompes, échangeurs

### Les canaux de la membrane mitochondriale :

Au niveau de la mitochondrie, sont localisés le VDAC participant à la formation du Permeability Transition Pore (PTP) et le Mitochondrial Uniporteur Channel (MCU).

Le **VDAC** (Voltage-Dependent Anion Channels) est un canal anionique voltage dépendant localisé au niveau de la membrane externe mitochondriale (d'environ 30 kDa). Il est composé de 19 brins  $\beta$  et d'un feuillet  $\alpha$  localisé horizontalement au milieu du pore. Le VDAC est fermé lorsque le potentiel de membrane est proche de -30 mV et s'ouvre quand le potentiel est proche de 0 mV mais est perméable en permanence aux sels simples. Il permet la diffusion de petites molécules énergétiques (ATP, malate) et également du calcium, nécessaire au fonctionnement de la pyruvate déshydrogénase et de l'isocitrate déshydrogénase, impliquées dans le métabolisme énergétique. Différentes enzymes ayant besoin d'ATP pour fonctionner se fixent à ce canal au niveau de la surface mitochondriale comme l'hexokinase ou encore la glucokinase, ce qui leur permet d'accéder préférentiellement à ce substrat. Lors de la mise en place du processus apoptotique, le VDAC va participer à la formation du PTP décrit ci-dessous. (Blachly-Dyson and Forte, 2001) Les molécules de la famille Bcl-2 ont la capacité de se lier au VDAC permettant ainsi sa régulation, ce qui sera développé dans le paragraphe calcium et contrôle de l'apoptose. (Figure 42)

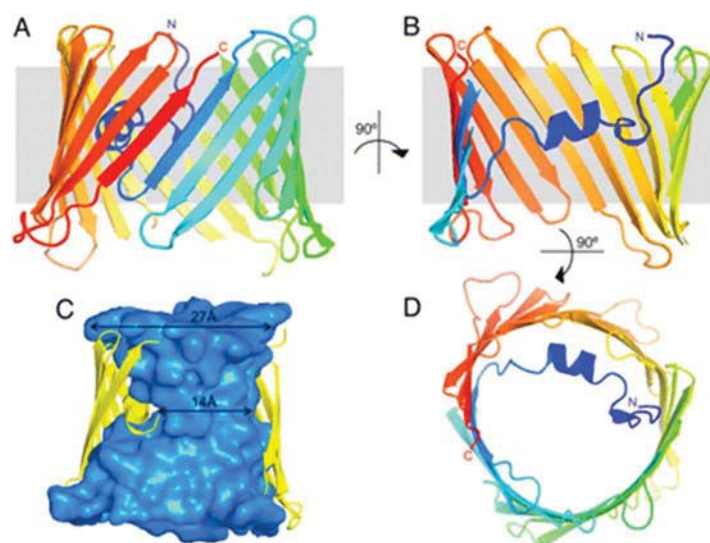
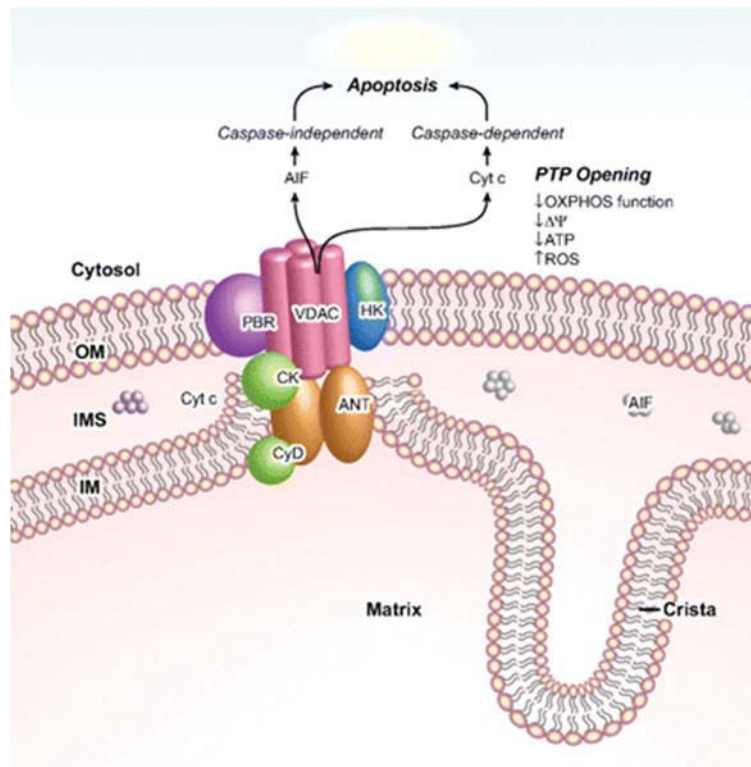


Figure 42 : Structure du VDAC. (Ujwal et al., 2008)

Le **PTP** est un complexe multi-protéines composé notamment du VDAC au niveau de la membrane mitochondriale externe, de l'ANT (transporteur des nucléotides adényliques) au niveau de la membrane mitochondriale interne et d'une protéine matricielle, la cyclophiline D. (Figure 43)



**Figure 43 : Le PTP mitochondrial. (Nageswara et al., 2007)**  
**Autres composants du PTP : PBR (Peripheral benzodiazepine receptor) ; HK (hexokinase) ; CK (creatine kinase).**  
**IMS : PTPintermembrane space ; Cyt c : cytochrome c ; OXPHOS : Oxidative phosphorylation ;  $\Delta\Psi$  : gradient électrochimique transmembranaire ; ROS : Oxygen Reactive Species.**

Afin de préserver le gradient de concentration de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, nécessaire à la synthèse d'ATP, le transport de molécules chargées électriquement est extrêmement régulé par des mécanismes de transports actifs. Une diminution du potentiel de membrane induite ( $\Psi_m$ ) par une entrée massive de calcium, une accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène ou de phosphate inorganique dans la matrice de la mitochondrie provoque l'ouverture prolongée du PTP. La membrane interne mitochondriale devient alors perméable à toutes les molécules de taille inférieure à 15000 Daltons (Da). Ce phénomène aura pour conséquence une entrée massive d'eau dans la mitochondrie (pour rétablir l'osmose). Un gonflement de la mitochondrie est alors observé et induit la sortie de molécules pro-apoptogènes telles que le cytochrome c et l'AIF, de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytoplasme cellulaire. L'enveloppe externe mitochondriale finit par se rompre, induisant également la sortie de cytochrome c. (Dubois et al., 2016)

Le **MCU** est une protéine composée de deux hélices et deux domaines transmembranaires séparés par une boucle enrichie en résidus acides, localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale. En s'oligomérisant, elle permet une entrée de calcium au niveau de la matrice mitochondriale. Ces protéines s'oligomérisent également avec le composé MCUB qui régulerait négativement l'entrée de calcium en modifiant la charge électrique du canal. Ce complexe fait aussi intervenir la protéine EMRE (Essential MCU Regulator) qui selon les études aurait un rôle structural ou un rôle de senseur du calcium. (De Stefani et al., 2015)

L'ouverture de ce canal est sous la dépendance du potentiel de membrane généré par le transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et du gradient de concentration entre la mitochondrie et le cytoplasme. Deux protéines régulatrices de ce canal sont bien identifiées : les MICU1 et MICU2. Elles empêchent l'ouverture du canal lorsque la concentration calcique extra-mitochondriale est faible. (De Stefani et al., 2015) (Mammucari et al., 2016) (Figure 44)

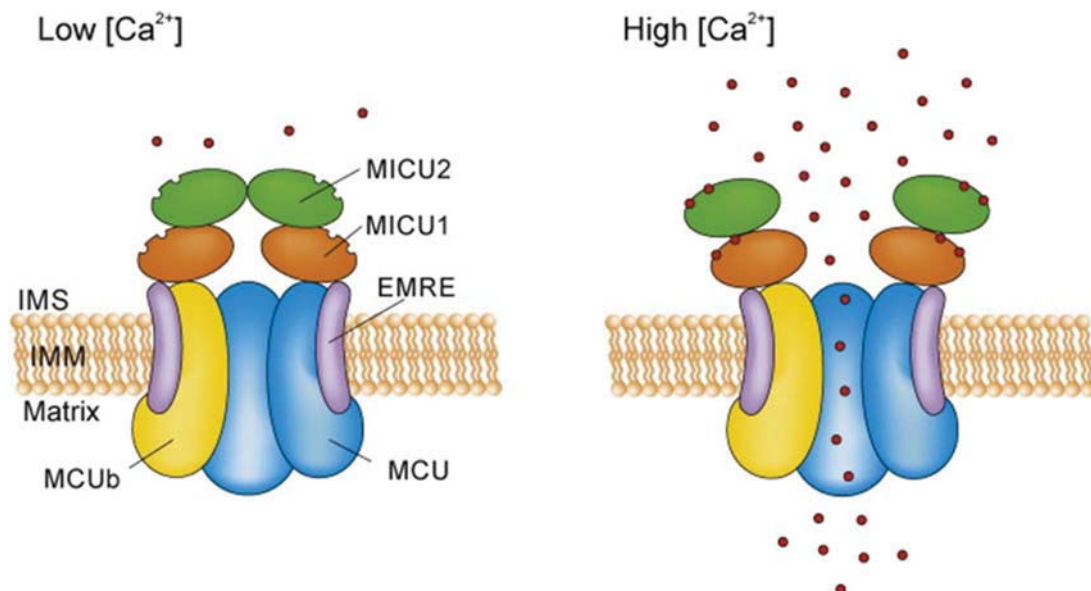


Figure 44 : Structure du canal MCU. (Mammucari et al., 2016)

#### Les canaux et pompes de la membrane du RE :

A la surface du RE, sont identifiés les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP3R), les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les pompes sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA).

L'**IP3R** permet le relargage du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. Il existe 3 sous-types d'IP3R : IP3R1 (en grande quantité dans le système nerveux central), IP3R2 (ubiquitaire mais retrouvé en particulier dans la moelle épinière et les cellules gliales) et IP3R3 (système digestif, pancréas, cerveau, reins). C'est un récepteur tétramérique ; chaque sous-unité est composée de 6

domaines transmembranaires, d'une boucle luminale entre les domaines transmembranaires 5 et 6 qui permet la constitution du pore et d'une extrémité cytoplasmique capable de fixer une molécule d'inositol triphosphate (IP3). Cette fixation provoque un changement conformationnel qui induit l'augmentation de l'affinité du récepteur pour le calcium et permet l'ouverture du pore. Néanmoins, le calcium cytoplasmique a un double effet sur le récepteur. Il stimule son activation lorsqu'il est présent en faible concentration et l'inhibe lorsqu'il est en concentration supérieure à 300 nM. La concentration de calcium luminal a aussi un effet sur l'ouverture du pore en augmentant sa sensibilité pour l'IP3. (Berridge, 2012)

L'IP3R est régulé par de multiples molécules : les ROS ou la substance fongique adénophostine. D'autres molécules ont un rôle modulateur. Elles sont activatrices ou inhibitrices selon le contexte cellulaire. Parmi elles, on distingue l'AMPC ou le GMPc. Les membres de la famille Bcl-2 ont également un impact sur la régulation de ce canal qui sera développé dans le paragraphe calcium et contrôle de l'apoptose. Enfin, l'IP3R-binding protein Released with Inositol Triphosphate (IRBIT) joue le rôle d'un inhibiteur compétitif de l'IP3 sur son site de fixation, lorsqu'il est phosphorylé. La Calmoduline, la xestospongine, la caféine, le 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) et l'ERp44 sont d'autres inhibiteurs connus de ce canal. Enfin, Akt (ou PKB) est capable de phosphoryler l'IP3R et d'inhiber le relargage de calcium. (Berridge et al., 2003) (Berridge, 2012) (Figure 45)

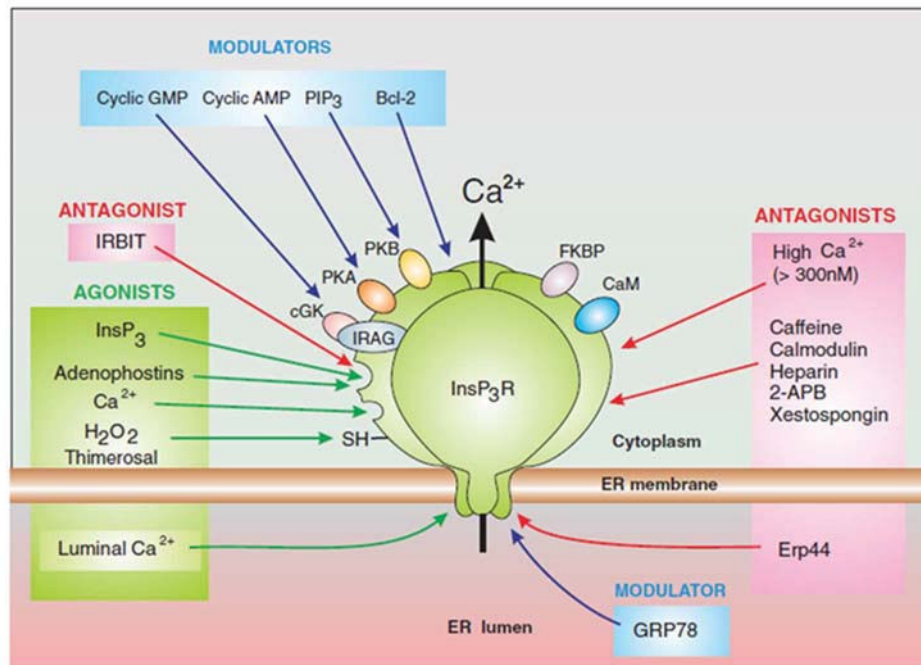


Figure 45 : Régulation de l'IP3R. (Berridge, 2012)

Les **RYR**, homotétramères composés de 4 hélices transmembranaires et d'une extrémité cytoplasmique, sont également présents sous 3 isoformes : RYR1 (retrouvés dans les muscles squelettiques) RYR2 (principalement dans les muscles cardiaques et le cerveau) et RYR3 (cerveau) et permettent également la sortie de calcium du RE vers le cytoplasme.

RYR2 est un des canaux qui relarguent le plus de calcium dans de nombreuses cellules excitables. Le fonctionnement de ce canal provoque un courant «Calcium-Induced Calcium-Release» (CICR). En effet, le principal mécanisme d'activation de RYR2 est induit par une sortie de calcium cytoplasmique, notamment par les IP3R, qui active l'ouverture de RYR2 et induit une nouvelle sortie de calcium plus importante dans le cytoplasme. Ce phénomène va permettre la formation de vagues calciques capables de passer d'une cellule à l'autre induisant par exemple le battement coordonné des cils bronchiques. (Berridge et al., 2000)

La liaison à ce récepteur de la calmoduline non liée au calcium, appelée Apo-Calmoduline, de la ryanodine (à faible concentration), de la caféine, ou la phosphorylation de ce récepteur par la protéine kinase A ou la calcium calmoduline-kinase II auront un effet activateur. Au contraire les fortes concentrations de ryanodine, la calmoduline liée au calcium et associée à une trop forte concentration de calcium cytoplasmique, les phosphatases PP1 (protein phosphatase 1) et PP2A (protein phosphatase 2A), FKBP12 (FK506-binding protein 12) et FKBP12.6 (qui stabilisent respectivement RYR1 et RYR2 sous leur forme fermée) auront une action inhibitrice sur ces canaux. (Figure 46)

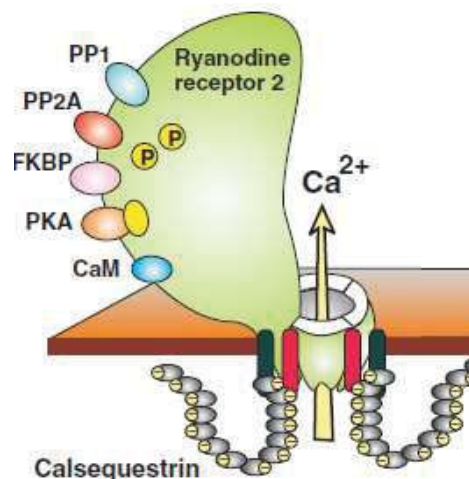


Figure 46 : Régulation de RYR2. (Berridge, 2012)

Les pompes **SERCA** permettent le passage actif du calcium du cytoplasme vers le RE. Elles sont issues de 3 gènes différents *SERCA1*, *SERCA2* et *SERCA3* et après épissage alternatif conduisent à 14 ARNm codant donc pour une grande variété de SERCA. Les SERCA1 sont principalement exprimées dans les

cellules musculaires, les SERCA2a au niveau du muscle cardiaque, les SERCA2b sont ubiquitaires et les SERCA3 dans les cellules non musculaires comme les cellules pulmonaires, cardiaques et cérébrales. Au niveau structural, cette molécule possède une seule sous-unité composée de 10 hélices transmembranaires et d'un site de phosphorylation et de fixation pour l'ATP au niveau cytoplasmique. La protéine kinase A et la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinases augmentent l'activité des SERCA en phosphorylant la protéine transmembranaire phospholambane, principal inhibiteur de ces pompes et régulateur majeur du rythme cardiaque. Par ailleurs, la Thapsigargine est un inhibiteur sélectif de ses SERCA issu de la plante *Thapsia garganica*. (Chemaly et al., 2017) (Landry et Gies, 2003) (Figure 47)

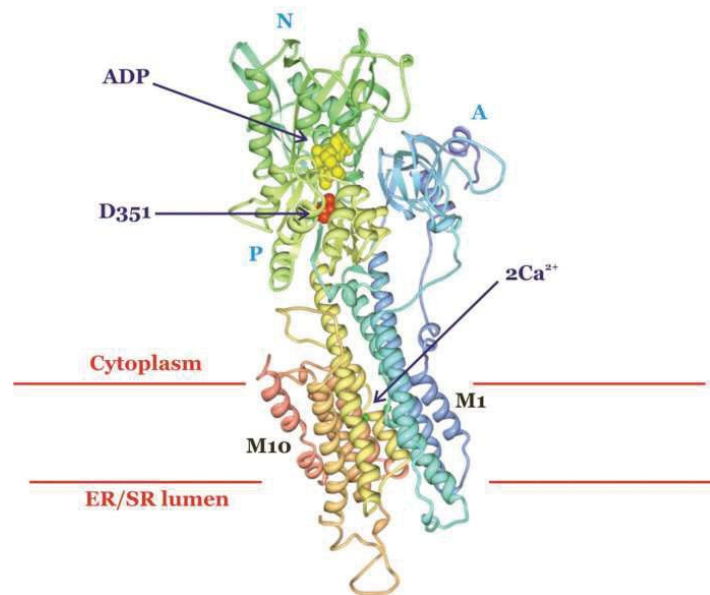


Figure 47 : Structure cristallisée d'une pompe SERCA dans son état lié à l'ADP et au calcium. D351 est le résidu phosphorylé pendant le passage du calcium dans le RE. (Watson, 2015)

Au niveau de la membrane plasmique des cellules, de nombreux canaux et pompes régulent la concentration intracellulaire de calcium. Ainsi, sont identifiés notamment les pompes plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA), l'échangeur sodium-calcium (NCX), les canaux calciques voltage-dépendants (VOCC), les canaux Transient Receptor Potential (TRP) et les canaux calciques capacitifs (SOC).

Les **PMCA**, dont il existe 4 isoformes et plus de vingt sous-types différents issus d'un épissage alternatif, ont une structure similaire aux pompes SERCA et permettent une sortie active de calcium de la cellule par hydrolyse d'ATP en ADP. Les isoformes PMCA1 et PMCA4 sont ubiquitaires alors que PMCA2 et PMCA3 sont principalement localisées au niveau des tissus du cerveau, des muscles striés et de la glande mammaire. Ces PMCA ont une faible affinité pour le calcium et sont activées par la fixation de la calmoduline liée au calcium au niveau de son extrémité C-terminale ; cet

encombrement empêche alors l'auto-inhibition de la pompe. Par ailleurs, les calpaïnes, en clivant les PMCA permettent également leur activation permanente. Enfin les phosphorylations au niveau de l'extrémité C-terminale cytosolique des PMCA par les Protéines Kinases A et C (PKA et PKC) permettent soit l'activation ou soit l'inhibition de ces pompes selon les isoformes ciblées. Par exemple, la phosphorylation de la PMCA2a par la PKC empêche la fixation de la calmoduline alors que la phosphorylation de la PKC sur la PMCA4b est activatrice. (Brini and Carafoli, 2011) (Landry et Gies, 2003) (Figure 48)

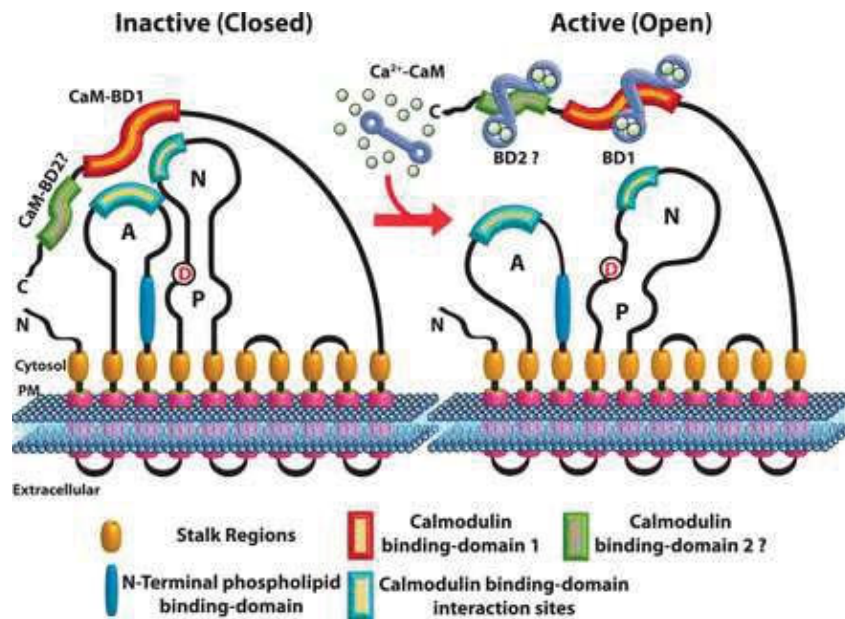


Figure 48 : Structure et activation des PMCA (Lopreiato et al., 2014)

Le **NXC**, dont on recense 3 isoformes composées de 11 hélices transmembranaires, est un échangeur permettant la sortie d'un ion calcium contre l'entrée de trois ions sodium dans la cellule. Cet échangeur a une faible affinité pour le calcium mais une grande capacité d'activation et de relargage du calcium, en particulier dans les cellules excitables. Il fonctionne en coopération avec la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$  qui fait sortir 3 ions sodium et entrer 2 ions potassium permettant ainsi de garder une concentration adéquate de sodium. En fonction du gradient électrochimique et du potentiel de membrane, le NCX peut fonctionner dans le sens inverse et faire alors entrer du calcium dans la cellule. Cet échangeur est essentiel dans le processus de contraction cardiaque. (Carafoli et al., 2001) (Berridge, 2012 ) (Figure 49)

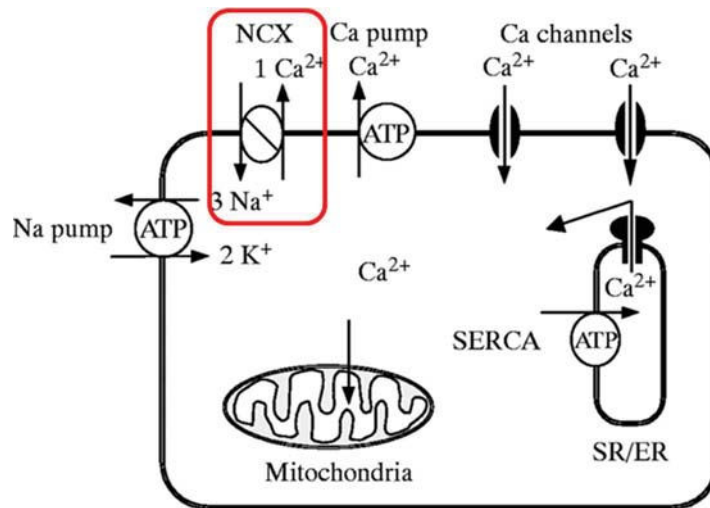


Figure 49 : Schéma du NCX au sein de la cellule. (Wang et al., 2002)

Les **VOCC** sont des canaux qui favorisent l'entrée de calcium dans la cellule après leur activation par un potentiel membranaire. Ils sont présents dans les cellules excitables telles que les cellules cardiaques, musculaires ou neuronales mais également au niveau de cellules non-excitables. Ils sont composés de cinq sous-unités :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , (comprenant chacune différentes isoformes)

La sous-unité  $\alpha 1$  est considérée comme la sous-unité principale du canal puisque qu'elle forme le pore permettant le passage du calcium, mais c'est également le senseur du voltage et la sous-unité qui contient la plupart des sites de régulation du canal par les protéines kinases et les différents inhibiteurs. Les sous-unités  $\alpha 2$  (extracellulaire) et  $\delta$  (composée d'un segment transmembranaire) forment un hétérodimère glycosylé lié par une liaison disulfide. La sous-unité  $\beta$  est intracellulaire et interagit avec  $\alpha 1$ . Elle a notamment pour rôle de moduler l'activité de cette dernière en augmentant le courant transmembranaire et en modifiant la cinétique d'ouverture du canal. Enfin, la plus petite sous-unité,  $\gamma$ , contient quatre domaines transmembranaires et a pour rôle d'augmenter l'état stable d'inactivation du canal. (Figure 50)



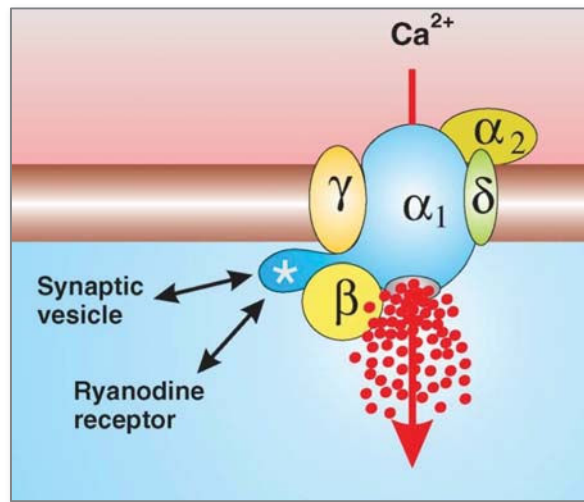


Figure 50 : Structure des VOCC (Berridge, 2012)

Ces canaux sont activés par des modifications du potentiel de membrane et sont répartis en six classes L (Long-Lasting), N (Neural ou Non-L), P (Purkinje), Q, T (Transient), R (Residual). Les canaux de types L, P, Q, N, R sont sensibles à de fortes dépolarisations et les canaux de type T à de faibles dépolarisations. Quelques millisecondes après la dépolarisation de la membrane plasmique, le canal s'ouvre et laisse entrer le calcium, puis s'en suit une période réfractaire pouvant durer de plusieurs dizaines de millisecondes à quelques secondes lorsque la membrane est toujours dépolarisée. Enfin le canal se referme moins d'une milliseconde après la repolarisation. (Figure 51)

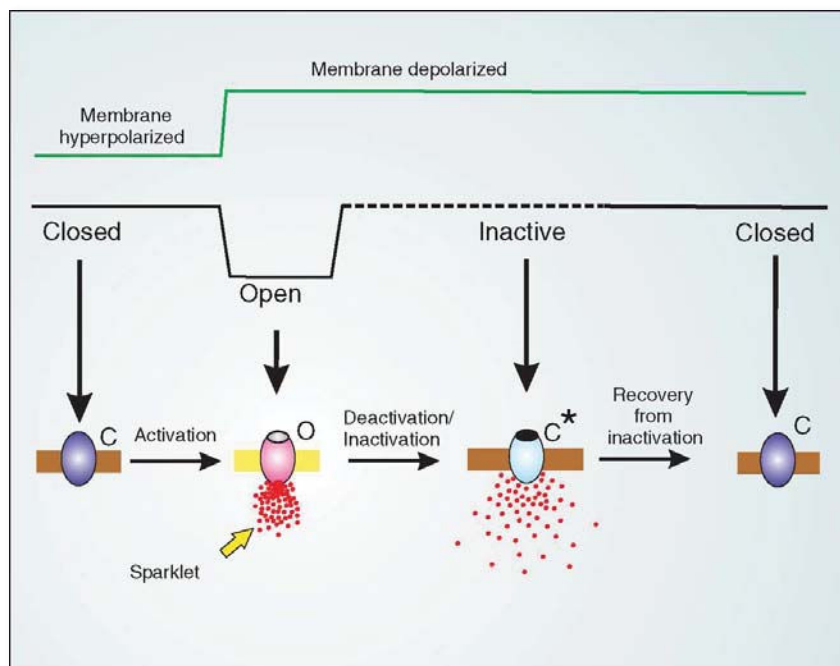


Figure 51 : Mécanisme d'activation des VOCC (Berridge, 2012)

Ces phénomènes vont intervenir dans la transmission synaptique ou encore au niveau de la contraction musculaire. En effet, dans le processus de d'excitation-contraction, RYR1 interagit physiquement avec le canal calcique voltage dépendant de type L, Cav1.1. Une dépolarisation provoque alors un changement de conformation de Cav1.1 qui permet alors l'ouverture de RYR1. (Figure 52) (Figure 53)

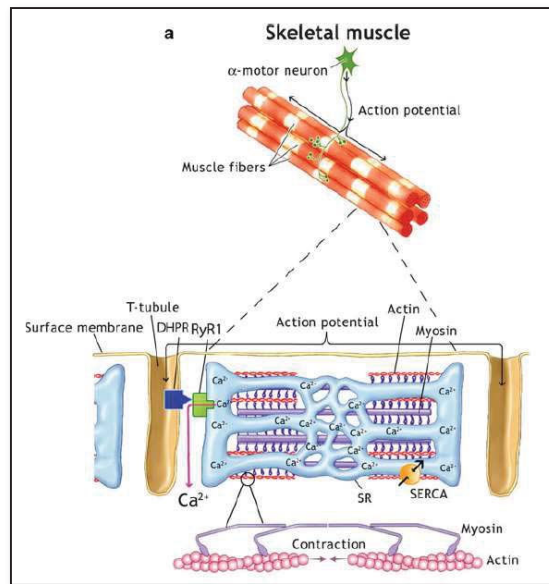


Figure 52 : Activation de RYR1 par interaction physique avec un canal calcique voltage-dépendant activé. (Lanner, 2012)

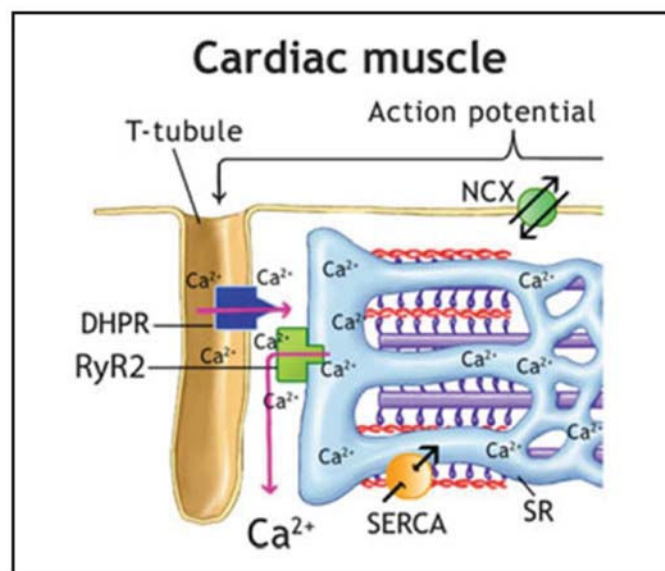


Figure 53 : Activation de RYR2 via l'activation d'un canal calcique voltage-dépendant. (Lanner, 2012)

Il existe des inhibiteurs pour chaque classe de VOCC. Par exemple, les canaux de type L sont bloqués par des molécules pharmacologiques fréquemment utilisées pour soigner les pathologies cardiaques que sont les dihydropyridines, les alkylamines et les benzothiazépines qui limiteront l'entrée de calcium en réponse à une dépolarisation. (Carafoli et al., 2001) (Dolphin, 2006) (Tableau 5)

Tableau 5 : Inhibiteurs pharmacologiques et localisation des VOCC (Weiss and De Waard, 2006)

	Sous-unité $\alpha_1$	Courant	Pharmacologie	Localisation
Haut seuil d'activation (HSA)	$\alpha_{1S}$ (Ca <sub>v</sub> 1.1)			Muscle squelettique
	$\alpha_{1C}$ (Ca <sub>v</sub> 1.2)	Type L	Dihydropyridines (par exemple, nifédipine) Phénylalkylamines Benzothiazépines	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines
	$\alpha_{1D}$ (Ca <sub>v</sub> 1.3)			
	$\alpha_{1F}$ (Ca <sub>v</sub> 1.4)			
	$\alpha_{1A}$ (Ca <sub>v</sub> 2.1)	Type P/Q	$\omega$ -Agatoxine IVA $\omega$ -Agatoxine IIIA $\omega$ -Conotoxine MVIIC	Neurones, cellules pancréatiques $\beta$
	$\alpha_{1B}$ (Ca <sub>v</sub> 2.2)	Type N	$\omega$ -Conotoxine GVIA $\omega$ -Conotoxine MVIIA $\omega$ -Agatoxine IIIA	Neurones
$\alpha_{1E}$ (Ca <sub>v</sub> 2.3)	Type R	Nickel, Cadmium	Neurones, cellules endocrines	
Bas seuil d'activation (BSA)	$\alpha_{1G}$ (Ca <sub>v</sub> 3.1)	Type T	Benzimidazoles (par exemple, mibéfradil) Amiloride Éthosuximide Kurtoxine Nickel	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines, spermatozoïdes
	$\alpha_{1H}$ (Ca <sub>v</sub> 3.2)			
	$\alpha_{1I}$ (Ca <sub>v</sub> 3.3)			

Les TRP, canaux d'entrée du calcium, sont regroupés en sept familles majeures au sein desquels il existe différents variants d'épissages : TRPA (ankyrine), TRPC (canonique), TRPM (melastatine), TRPV (vanilloïde), TRPML (mucolipine) TRPP (polycystine), TRPN (No mechanoreceptor potential C). (Figure 54)

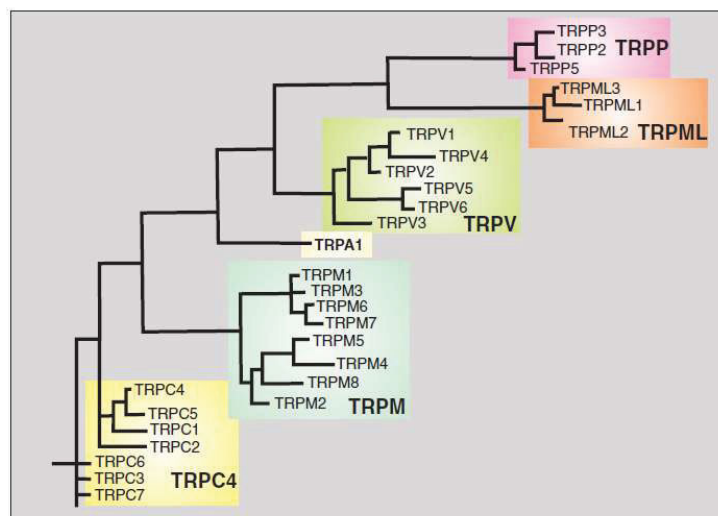


Figure 54 : Arbre phylogénétique de la famille des canaux TRP (Berridge, 2012)

A l'exception des TRPM4 et TRPM5 qui sont plus sélectifs pour les cations monovalents et des TRPV5 et TRPV6 qui sont très sélectifs pour le calcium, ce sont des canaux non sélectifs pour les cations mono- et divalents. (Smani et al., 2015) Ce sont des homo- ou hétéro-tétramères pour lesquels chaque sous-unité est constituée de six domaines transmembranaires, le pore ionique se trouvant localisé entre les cinquième et sixième domaines. (Figure 55)

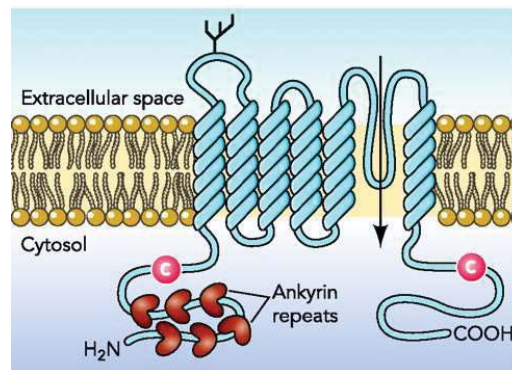


Figure 55 : Schéma de la structure des canaux TRPV5 (Hoenderop and Bindels, 2008).

Ces canaux sont exprimés de façon relativement ubiquitaire et sont une voie majeure d'entrée du calcium dans les cellules non-excitables. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la vasorégulation pour les TRPC3, TRPC4, TRPC6, la perception de l'environnement comme la température pour les TRPV1, TRPM8, TRPA1 et sont activés par diverses stimuli comme une élévation ou une baisse de la température, les voies de signalisation et messagers cellulaires (notamment l'activation des récepteurs couplés aux protéines G ou la calmoduline), la concentration de calcium intracellulaire ou encore l'hypo-osmolarité. L'inhibition ces canaux est également possible. Par exemple, les lanthanides inhibent TRPM1 et les SB366791 et 5'-iodoresiniferatoxin inhibent TRPV1. (Clapham, 2003) (Tableau 6)

**Tableau 6 : Identification des propriétés des sous-unités des canaux TRP. (Clapham, 2003)**

TRP	Functions	Interacting proteins	Activation	$P_{Ca}/P_{Na}$
C1 250687	Central nervous system (CNS)	TRPC4; TRPC5; TRPC3 (embryo); calmodulin; IP <sub>3</sub> R; caveolin-1; G $\alpha_q$ 11; PMCA	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); TKR-PLC $\gamma$ ?	<10
C2 *602343 C3 150981	Pheromone sensing Vasoregulation (resistance arteries); airway regulation; CNS	TRPC1 (embryo); PLC $\beta$ ; IP <sub>3</sub> R; ryanodine receptor; SERCA; caveolin-1; calmodulin	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); TKR-PLC $\gamma$ ? GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); DAG; TKR-PLC $\gamma$ ? [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ?	1.6
C4 262960	Vasoregulation; microvascular permeability?; CNS; gastrointestinal motility?	TRPC1; TRPC5; PLC $\beta$ ; NHERF via PDZ-binding domain; IP <sub>3</sub> R; calmodulin	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); TKR-PLC $\gamma$ ?; GTP $\gamma$ S; La <sup>3+</sup> ; calmidazolium	~1
C5 247868	CNS; growth cone morphology	TRPC1; TRPC4; calmodulin; PLC $\beta$ ; stathmin	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); GTP $\gamma$ S; La <sup>3+</sup>	~1
C6 159003	Vasoregulation (resistance arteries); airway regulation; smooth muscle?	TRPC3; TRPC7; calmodulin	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); DAG; TKR-PLC $\gamma$ ?; [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ; ALF <sub>2</sub> ; flufenamate	5
C7 283104		TRPC3; TRPC6; calmodulin	GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ); DAG; TKR-PLC $\gamma$ ?; [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	~0.5
V1 (VR1) 283010	'Hot' pepper and heat sensation; inflammatory thermal hyperalgesia; bladder distension sensation	TRPV3; calmodulin	$T > 43$ °C; capsaicin; resiniferatoxin; anandamide; H <sup>+</sup>	10 ( $P_{Mg}/P_{Na} \approx 5$ )
V2 (VRL1; GRC) 279746	Noxious heat sensing; muscle degeneration?; other pain pathways		$T > 53$ °C; insulin growth factor-1	3
V3 375034	Warm sensing?; pain?	TRPV1	$T > 30$ °C	~10
V4 (OTRPC4; VR-OAC) 287776	CNS osmotic sensing; pressure sensing (dorsal root ganglion); nociception; warm sensing	Calmodulin; Src family kinases	Hypo-osmolarity; $T > 24$ °C; phorbol esters; anandamide; arachidonic acid; epoxyeicosatrienoic acid	6
V5 (ECaC1; CaT2) 283369	Ca <sup>2+</sup> uptake in kidney; intestine?	TRPV6; S100A10/annexin 2	Constitutive	>100
V6 (ECaC2; CaT1) 302740	Ca <sup>2+</sup> uptake in intestine?	TRPV5; S100A10/annexin 2	Constitutive	>100
M1 (MLSN) 43265			ADP ribose; $\beta$ NAD; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ?	~1 (estimate)
M2 133517	Oxidant stress sensor?		Constitutive; hypo-osmolarity	1.6
M3 288911	Ca <sup>2+</sup> uptake in kidney?		[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	<0.05
M4 31608			T1R; T2R-G $\alpha_{i16}$ -PLC $\beta$ 2; [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	<0.05
M5 (Mtr1) 272287	Taste (sweet; bitter; umami)			
M6 (CHAK2) 272225	Mg <sup>2+</sup> uptake in kidney and intestine?			
M7 (TRP-PLIK) 33819	Cellular Mg <sup>2+</sup> homeostasis?	PLC $\beta$ 1; PLC $\beta$ 2; PLC $\beta$ 3; PLC $\gamma$ 1	PIP <sub>2</sub> ; tyrosine phosphate	0.3
M8 (CMR1) 366053	Noxious cold sensing; nociception; cancer?		$T < 25$ °C; menthol and icilin potentiate	1-3
A1 (ANKTM1) 186329	Noxious cold sensing		$T < 18$ °C; icilin potentiates	1.4 ( $P_{Ca} \approx P_{Mg}$ )
P2 (PC2; PKD2) 62001	Mechanosensing in cilia?; fertility?	PC1; Hax-1; cortactin	Mechanical stress?; [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ?	~1-5
P3 (PKD2L1) 159241	Kidney and retinal development?		[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	~4
P5 (PKD2L2) 272418			[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ?	~1-5 ( $P_{Mg} \approx 0$ )

Numbers in TRP column are Unigene designation (human, except for \*mouse). GPCR (G $_q$ -PLC $\beta$ ) indicates the canonical TRP signalling cascade. For complete table and tissue distribution, see <http://clapham.tch.harvard.edu/>.

Les **SOC** sont des canaux hautement sélectifs pour le calcium, et permettent l'entrée de calcium dans la cellule lorsque les stocks intracellulaires se vident. Cette entrée capacitive de calcium, également appelée Store-Operated Calcium Entry (SOCE) a été initialement décrit par J.W. Putney en 1986. (Putney, 1986) Ces SOC sont ubiquitaires et composés de deux sous-unités : Orai (calcium release-activated calcium channel protein comprenant 3 isoformes chez les mammifères : Orai 1, 2 et 3) et STIM (stromal interaction molecule, dont on connaît 2 isoformes : STIM 1 et 2). Les composés majoritaires des SOC sont STIM1 et Orai1. Orai est situé au niveau de la membrane plasmique et forme le pore permettant l'entrée de calcium dans la cellule et STIM, senseur du calcium, est localisé au niveau de la membrane du RE (l'isoforme STIM1 est également retrouvée au niveau de la membrane plasmique). Orai1 est composé de 4 domaines transmembranaires et des régions C- et N-terminales cytoplasmiques qui permettront l'interaction avec STIM1. STIM1, ne contient qu'un domaine transmembranaire et plusieurs domaines fonctionnels comme le domaine luminal EF-hand qui permet l'interaction avec le calcium, le domaine SAM (sterile-alpha motif) qui a un rôle dans l'agrégation des STIM1 entre-elles, et deux hélices cytoplasmiques qui comprennent le site d'activation des CRAC (Calcium Release Activated Calcium) (CAD) ou la région d'activation STIM1-Orai1

(SOAR). Ce site est la région catalytique de STIM1 qui va permettre la liaison à Orai1 et son activation. (Figure 56)

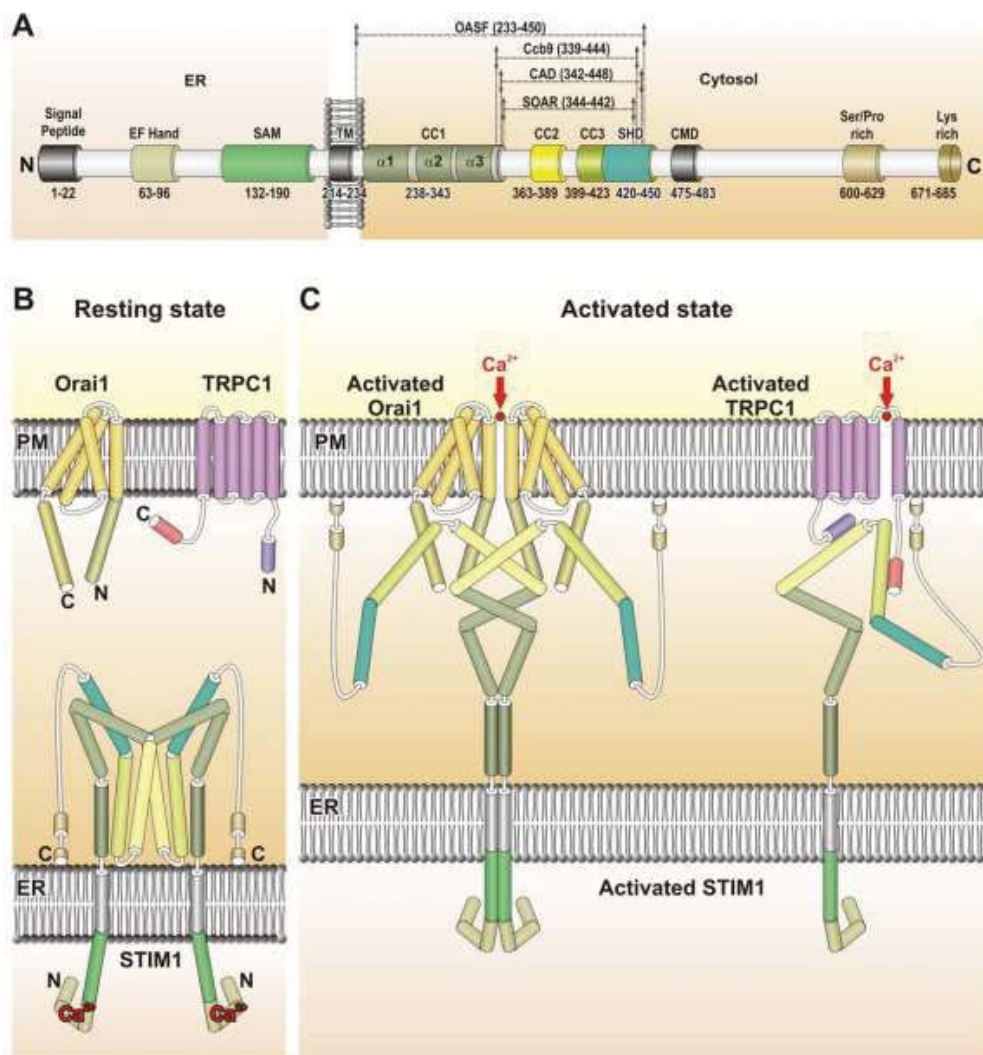


Figure 56 : Représentation schématique de STIM1 humain (A) et de l'interaction de STIM1 avec les canaux perméables au calcium Orai1 et TRPC1 (B et C). (Jardin and Rosado, 2016)

La protéine STIM1, est capable de percevoir la diminution de calcium dans le RE grâce à ses domaines de EF-hand. Initialement repliée au niveau de la membrane du RE, cette protéine change alors de conformation, s'oligomérisse avec d'autres molécules STIM1 puis se lie à la membrane plasmique et à Orai1 pour permettre l'ouverture des canaux et ainsi une entrée de calcium dans la cellule. (Yeung et al., 2017). L'ouverture de ces canaux provoque un courant électrique à la membrane, mesurable par la technique du patch clamp, appelé  $I_{CRAC}$  (calcium release-activated channels). (Figure 57)

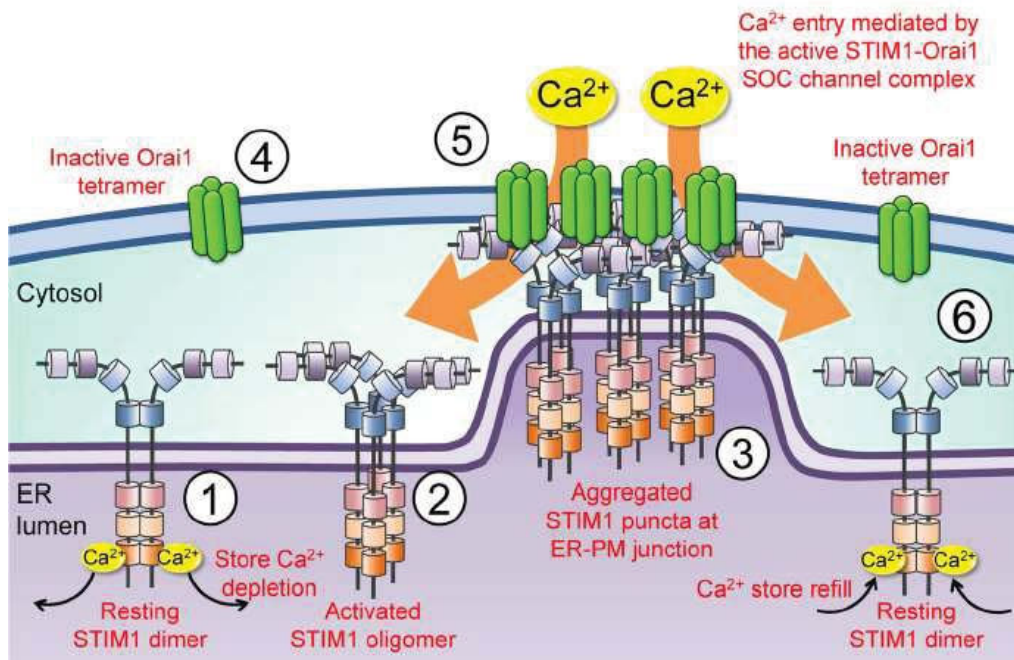


Figure 57 : Activation des SOC (Chen et al., 2013).

Il existe différentes molécules inhibitrices des SOC. Parmi elles, on recense, le YM58483, le SFK96365 ou le carboxyamidotriazole.

Par ailleurs, STIM1 est également capable de se lier à TRPC1 pour induire un courant appelé  $I_{soc}$ . En effet, l'interaction STIM1/Orai1 permettrait le recrutement de TRPC1 à la membrane qui, après activation par STIM1 engendrerait également une entrée de calcium. Ambudkar propose un modèle illustré ci-dessous. Après une déplétion des stocks, les protéines STIM1 s'agrègent entre elles et se transloquent au niveau de la jonction de la membrane du RE et la membrane plasmique. Orai1 est alors recruté au niveau des agrégats de STIM1 et il en résulte l'activation du canal CRAC. L'entrée de calcium entraîne alors l'insertion de vésicules contenant TRPC1 à la membrane plasmique.  $I_{crac}$  est alors généré par Orai1+STIM1 et  $I_{soc}$  est généré par la combinaison des canaux TRPC1+STIM1 et de Orai1+STIM1. (Figure 58) Par ailleurs, l'activation de TRPC1 semble dépendante d'Orai1 puisque l'absence d'Orai1 empêche une entrée de calcium induite par STIM1 sur TRPC1. (Ambudkar et al., 2017)

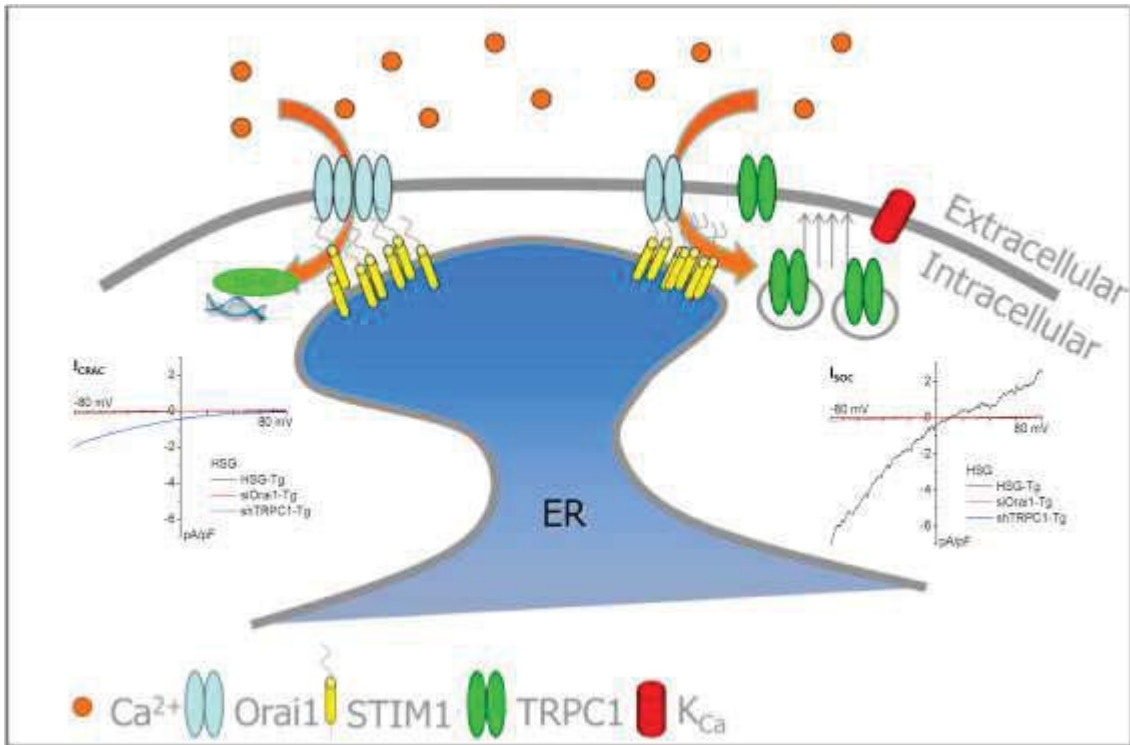


Figure 58 : Modèle proposé pour l'activation de TRPC1. (Ambudkar et al., 2017)

## B. Les récepteurs

Les récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) sont également des acteurs majeurs dans l'initiation du signal calcique. En effet, la liaison à leurs ligands permet d'activer la phospholipase C (PLC) ce qui génère l'IP3 et provoque une libération de calcium du RE.

Les **RCPG**, représentent la plus grande famille de récepteurs identifiée et permettent l'intégration d'un signal environnemental à l'intérieur de la cellule. Ils sont composés de sept domaines transmembranaires et sont capables de capter des stimuli extérieurs tels que la lumière et les odeurs ou de lier de nombreux ligands endogènes tels que l'angiotensine, le calcium et la dopamine. Leur liaison permet alors l'activation d'une protéine G. Ces protéines sont composées de trois sous unités  $\alpha$  et  $\beta/\gamma$ . Elles sont réparties en différentes familles et diffèrent par leur sous unité  $\alpha$ . Elles ont alors des cibles différentes. Ainsi, sont identifiées les sous unités  $\alpha_s$  induisant notamment une activation de l'adénylyl cyclase (ou adénylate cyclase) et donc une augmentation de l'AMPC,  $\alpha_i$  qui au contraire permet une inhibition de l'adénylyl cyclase et une diminution de l'AMPC,  $\alpha_q$  qui active les PLC $\beta$  et augmente alors la concentration cytoplasmique de calcium et  $\alpha_{12}$  qui active la protéine de liaison au GTP Rho. (Dorsam and Gutkind, 2007) (Figure 59)



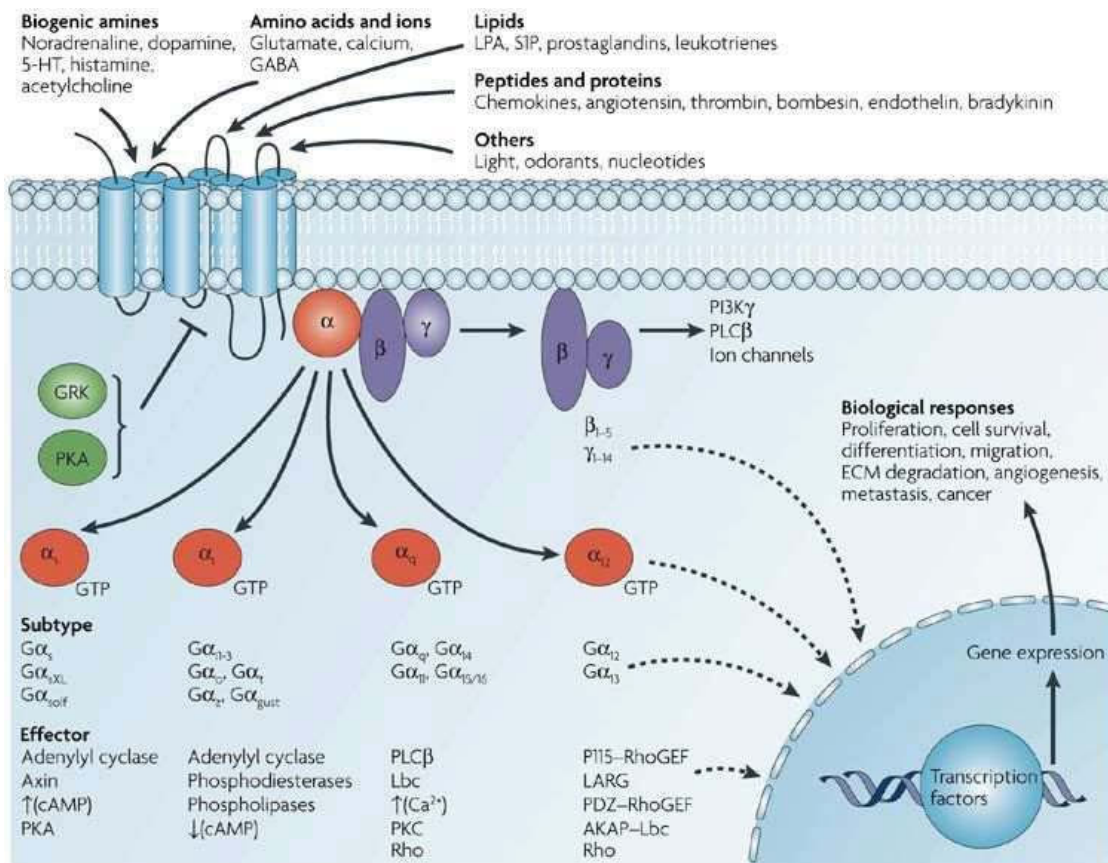


Figure 59 : Le récepteur couplé aux protéines G. (Dorsam and Gutkind, 2007)

Après activation du récepteur, une molécule de GDP est libérée et permet la fixation d'une molécule de GTP au niveau de la sous unité  $\alpha$  la protéine G, ce qui va lui permettre de se séparer des sous-unités  $\beta/\gamma$ . Ainsi, l'activation de la sous-unité  $\alpha_q$  libre active la PLC $\beta$  qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en Diacylglycérol (DAG) et en IP3. Ce dernier déclenchera l'ouverture des IP3R au niveau du RE, permettant la sortie de calcium de celui-ci. (Cabrera-Vera et al., 2003) Il a été mis en évidence que les sous-unités  $\beta/\gamma$  peuvent également activer la PLC $\beta$  et moduler les VOCC. (Ikeda, 1996) (Cabrera-Vera et al., 2003) Au cours de son activité, la sous-unité  $\alpha$  va hydrolyser la molécule de GTP en GDP et peut donc ainsi se réassocier aux sous-unités  $\beta/\gamma$ .

Les **RTK**, sont des récepteurs monomériques transmembranaires (à l'exception du RKT à l'insuline) comme le VEGFR, et sont activés par la fixation au niveau extracellulaire d'un grand nombre de protéines, cytokines et hormones. Ils vont activer les grandes voies de signalisation cellulaires telles que les MAPK, PI3K/Akt/mTOR ou STATs. (Figure 60)

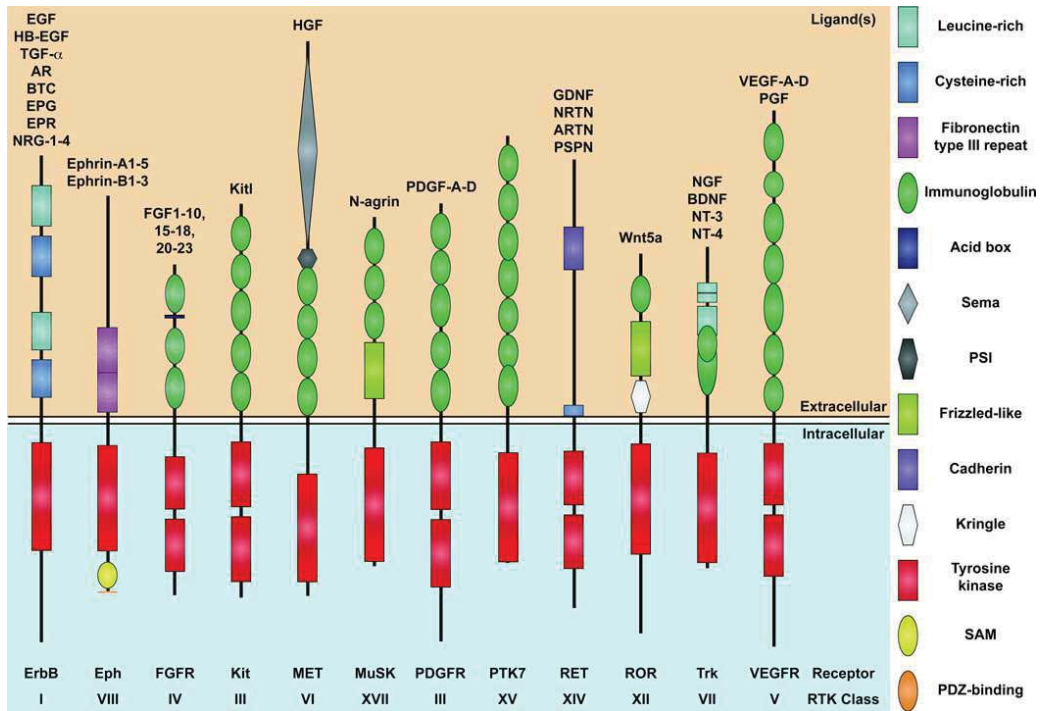


Figure 60 : Exemple de RTK (Fantauzzo and Soriano, 2015)

Lorsqu'ils sont liés par leurs ligands extra-cellulaires, ces récepteurs s'autodimérisent puis se phosphorylent l'un et l'autre au niveau de résidus tyrosines intracellulaires. Ceci provoque l'ancrage de protéines contenant des motifs de reconnaissance des phospho-tyrosines comme les motifs SH2 (SRC homology 2). Ces protéines sont par exemple, la PI3K ou la PLC $\gamma$ . Une fois fixées au récepteur et activées, elles activeront les voies de signalisation en aval. (Fantauzzo and Soriano, 2015) (Figure 61)

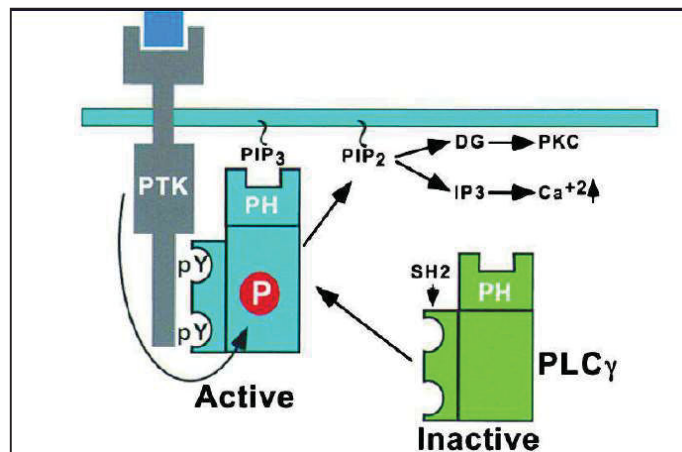


Figure 61 : Activation de la PLC par le RTK (Schlessinger, 2000)

Par ailleurs, le calcium peut également réguler l'activité de l'EGFR. Par exemple, l'inhibition des TRM7 permet d'inhiber l'EGFR et Akt en aval, via l'inhibition de la calmoduline des cellules cancéreuses prostatiques. (Sagredo et al., 2017)

Les PLC sont des enzymes ayant pour rôle d'hydrolyser le PIP2 en IP3 et en DAG, phénomène qui a pour conséquence la sortie de calcium du RE par les IP3R et l'activation des PKC par le DAG. Elles regroupent 6 familles de molécules composées de plusieurs isoformes. Ces enzymes ont des domaines structuraux communs : un domaine PH (pleckstrin homology) N-terminal, une série de 4 domaines EF-hand qui lient le calcium, un domaine catalytique triose phosphate isomérase divisé en 2 parties et un domaine C-terminal. (Figure 62)

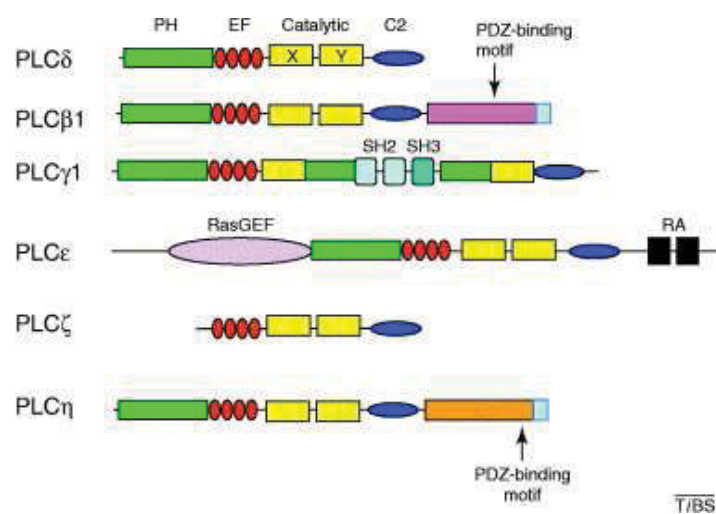


Figure 62 : Structure des six familles de PLC. (Cockcroft, 2006)

Chaque famille est activée par des molécules ou récepteurs particuliers tels que les RCPG, les RTK ou le calcium. Elles peuvent être inhibées par la molécule chimique U73122. (Gresset et al., 2012) (Figure 63)

PLC	Activation
PLCβ	RCPG <sub>q</sub>
PLCγ	RTK
PLCδ	PIP2, calcium et indirectement par les RCPG
PLCε	indirectement par les RCPG
PLCζ (uniquement dans les spermatozoïdes)	concentration calcique minimale de 10 nM ; activité maximale à 1 μM
PLCη	RCPG

Figure 63 : Mode d'activation des différentes familles de PLC (Gresset et al., 2012)

Voici donc une vue d'ensemble du calcium toolkit qui permet les entrées et sorties de calcium de la cellule et son passage d'un compartiment cellulaire à l'autre. (Figure 64)

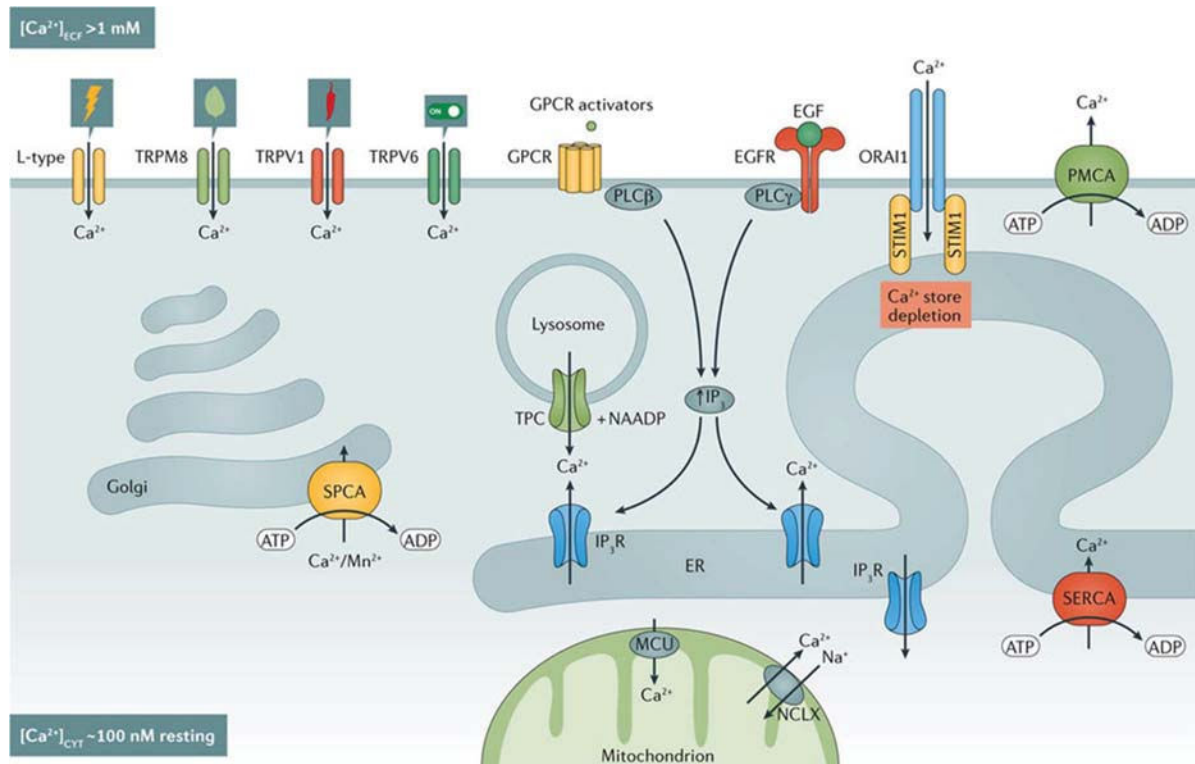


Figure 64 : Le calcium toolkit (Monteith et al., 2017)

### C. Les molécules activées par le calcium

Dans le cytoplasme, des molécules sont capables d'être activées par le calcium émis par l'ouverture des canaux ou l'activation des récepteurs. Ces molécules possèdent des domaines appelés EF-Hand. Ce domaine est caractérisé par deux hélices  $\alpha$  reliées perpendiculairement par une boucle permettant la liaison d'un ion calcium, à la manière d'une bille qui serait fixée entre le pouce et l'index d'une main, comme schématisé ci-dessous. (Beaudeau et al., 1999) (Figure 65)

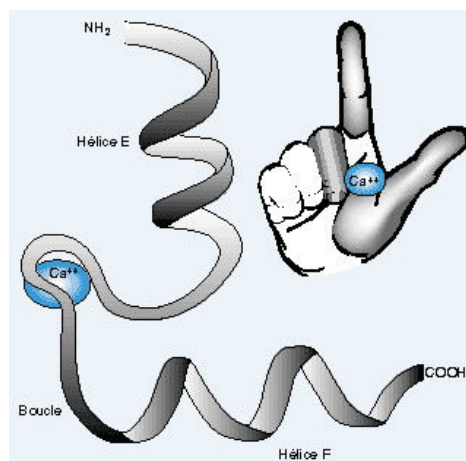


Figure 65 : Représentation schématique du motif liant le calcium EF-hand. (Beaudeau et al., 1999)

Ces domaines sont généralement retrouvés par paire et la fixation du calcium induit alors un changement de leur conformation, leur permettant ainsi d'interagir avec leurs protéines cibles. Il existe plus de 200 protéines au sein de la famille des molécules EF-hand comprenant la calmoduline, les protéines S100, la calcineurine, ou encore les calpaïnes.

Ces protéines ont pour principales fonctions de tamponner les variations de calcium cytoplasmiques, de transporter le calcium et de moduler l'activité de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. (Landry et Gies, 2003)

La **calmoduline** (CaM) est le régulateur majeur de la signalisation dépendante du calcium dans les cellules eucaryotes. C'est une protéine ubiquitaire formée d'une hélice  $\alpha$  centrale et deux domaines EF-hand à chaque extrémité. Lorsqu'elle lie quatre molécules de calcium sa conformation change, elle passe alors d'une forme «haltère» à une forme «pince» ce qui lui permet d'interagir avec ses nombreuses protéines cibles qu'elle peut alors activer. (Figure 66)

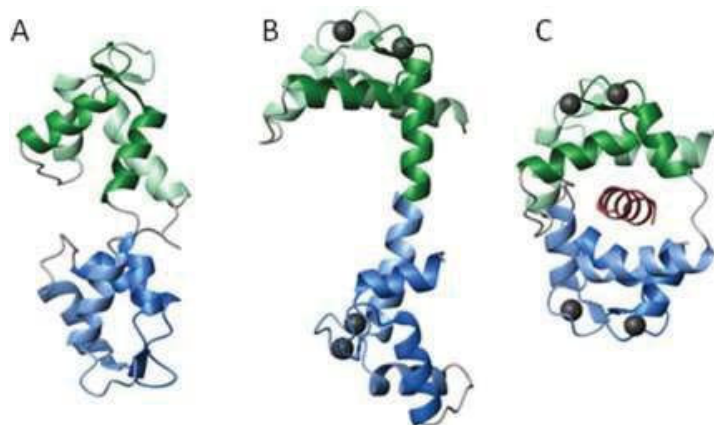


Figure 66 : Activation de la calmoduline par le calcium. (Slavov et al., 2013)

Une fois en conformation activée pour le calcium, elle se fixe notamment à de nombreux canaux calciques comme les PMCA qu'elle active. Elle peut également se lier et activer des molécules impliquées dans les voies de prolifération en se fixant à l'EGFR, la PI3K, la kinase SRC, à Akt *via* son domaine d'homology pleckstrin, ou encore aux CamK. Elle est donc impliquée dans la plupart des processus cellulaires. Cependant, elle peut également agir indépendamment de la fixation du calcium, elle est alors appelée apo-calmoduline (apo-CaM). Ainsi, l'apo-CaM et la  $Ca^{2+}/CaM$  sont toutes deux capables de se fixer à SRC et d'augmenter alors son activité tyrosine kinase. (Berchtold and Villalobo, 2014) (Dong et al., 2007) (Stateva et al., 2015)

Parmi les nombreuses protéines activées par les  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , on retrouve les **CaMKK** ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulin}$  dependant protein kinases kinases) et les **CaMK** ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulin}$  dependant protein kinases) qui sont des Sérines/Thréonines kinases. Elles ont une homologie de structure et possèdent toutes un domaine catalytique, un domaine de liaison avec  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  et un domaine d'autoinhibition. En l'absence de liaison avec la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , le domaine d'autoinhibition interagit avec le domaine catalytique, empêchant alors le fonctionnement de l'enzyme. La fixation de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  déplace le domaine d'autoinhibition et permet à l'enzyme d'exposer son site catalytique et ainsi de fonctionner. (Figure 67)

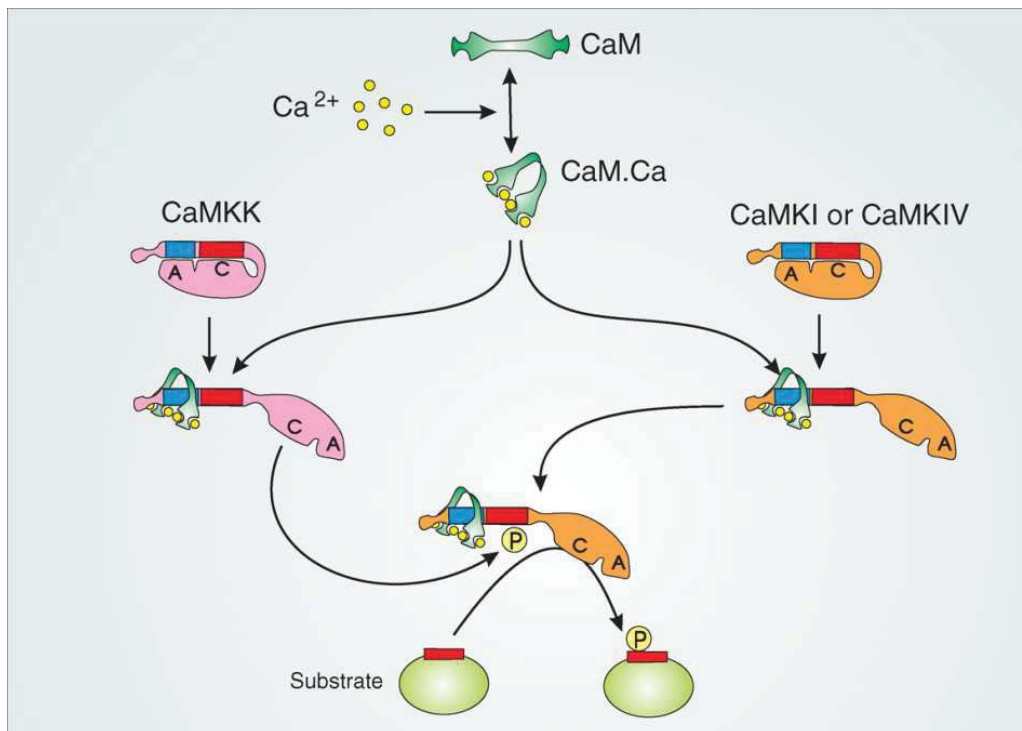


Figure 67 : Activation des CamKK et des CamKI et IV. (Berridge, 2012)

#### Les CamKK :

Il existe 2 isoformes des CaMKK : la  $\text{CaMKK}\alpha$  et la  $\text{CaMKK}\beta$  codées par deux gènes différents. Elles sont principalement exprimées dans le cerveau mais la forme  $\text{CaMKK}\alpha$  est aussi retrouvée dans la rate, le thymus et l'ovaire. Une fois activées par la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , les CaMKK vont aller phosphoryler les CaMKI et CaMKIV. Elles peuvent être inhibées par la PKA, qui, en empêchant l'interaction de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  avec les CaMKK, bloque l'activité de ces enzymes en réponse à l'augmentation de calcium intracellulaire. La  $\text{CaMKK}\beta$ , peut fonctionner de façon indépendante de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  après activation par cette dernière. (Gocher et al., 2017) (Swilius and Waxham, 2008)

Elles ont pour cibles principales CamKI, CamKIV et l'AMPK.

- La CaMKI :

La CaMKI est une kinase monomérique ubiquitaire dont il existe trois isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) codées par trois gènes différents. Elle est activée par la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  qui permet l'exposition du site catalytique et également du site de phosphorylation en Thr<sup>177</sup> par la CamKK, ce qui engendrera une augmentation l'activité de 10 à 20 fois de l'enzyme. Leurs substrats principaux sont la synapsin 1 et le c-AMP response element binding protein (CREB). La phosphorylation de CREB, protéine impliquée dans la régulation de la transcription, facilite sa liaison au site c-AMP response element (CRE) et permet l'initiation de la transcription. (Swulius and Waxham, 2008) (Sheng et al., 1991)

- La CaMKIV :

La CaMKIV, kinase monomérique dont il existe deux isoformes issues d'un épissage alternatif, est exprimée principalement dans les tissus neuronaux, les testicules pour l'isoforme  $\alpha$  et de façon différentielle pendant le développement dans les cellules granulaires du cervelet pour l'isoforme  $\beta$ . Comme la CaMKI, elle est activée par la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  puis par la CamKK par phosphorylation en Thr<sup>196</sup>. Elle peut, par la suite, s'autophosphoryler au niveau des sites riches en sérines et thréonines en N-terminale, ce qui lui permet à la fois d'avoir une activation maximale et indépendante de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  et ainsi de prolonger son activation après la stimulation calcique. Une autre autophosphorylation au niveau de la Ser<sup>331</sup> empêche la liaison de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Ses substrats principaux sont impliqués dans la régulation de la transcription et sont CREB, le serum response factor (SRF) et l'histone déacétylase 4 (HDAC4). (Swulius and Waxham, 2008)

La CaMKII :

On en recense quatre isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) issues de quatre gènes différents et qui s'associent en structure dodécamérique. CaMKII $\alpha$  et CaMKII $\beta$  sont très fortement exprimées dans le cerveau et CaMKII $\gamma$  et CaMKII $\delta$  sont exprimées de façon ubiquitaire. Lors d'une augmentation de calcium, la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se fixe à la CaMKII et l'active sans requérir l'intervention des CaMKK. Les premières sous-unités de la CaMKII, une fois activées par la CaM, peuvent phosphoryler la sous-unité adjacente en Thr<sup>286</sup> ou Thr<sup>287</sup> selon les isoformes et provoquer ainsi une activation indépendante du calcium. Cette phosphorylation augmente également l'affinité de 1000 fois pour la CaM. Deux autres sites d'autophosphorylation en Thr<sup>305</sup> et Thr<sup>306</sup> (ou Thr<sup>306</sup> et Thr<sup>307</sup>) peuvent eux empêcher la fixation de la CaM mais ne bloqueront pas l'activité autonome de l'enzyme si celle-ci a été phosphorylée préalablement en Thr<sup>286</sup>. (Hudmon and Schulman, 2002) (Giese et al., 1998) (Figure 68) Ces kinases sont bien identifiées dans l'activation d'Akt, que nous reverrons dans le paragraphe calcium et cancérogénèse.

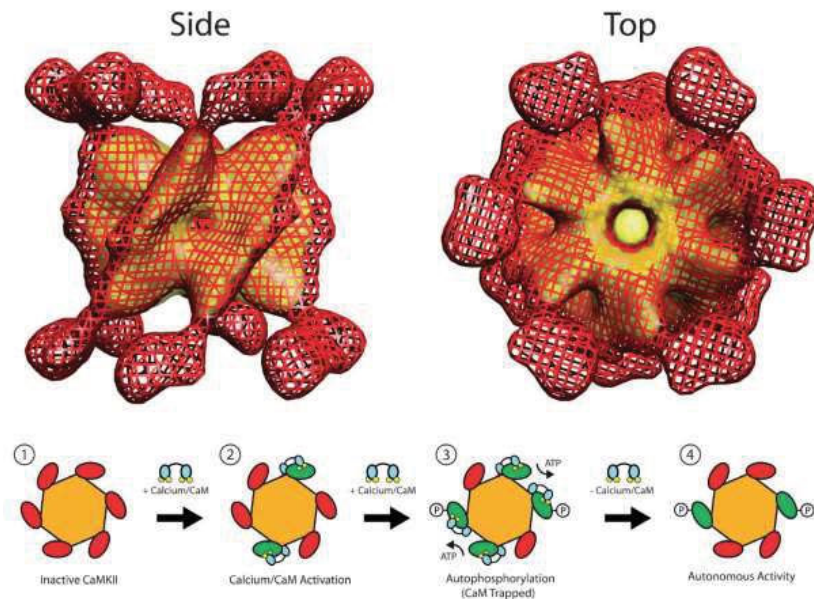


Figure 68 : Structure et activation de la CamKII. (Swulius and Waxham, 2008)

Enfin, il existe une autre famille de molécules pouvant être activées directement par le calcium, les **PKC**. Ce sont des Sérine/Thréonine kinases activées à la membrane, réparties en 3 familles. Elles possèdent toutes un domaine catalytique en C-terminal composé d'un site de liaison au substrat et d'un site de liaison à l'ATP et d'un domaine régulateur en N-terminal. Au niveau du domaine régulateur toutes les PKC possèdent un site pseudosubstrat (PS) qui maintient la protéine sous sa forme inactive. Ce sont les autres sites de ce domaine catalytique qui déterminent les co-facteurs nécessaires à l'activation de ces kinases et qui vont permettre de différencier les PKC. En effet, les cPKC (PKC conventionnelles regroupant les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ) possèdent les sites conservés C1 à C4 ainsi que les sites variables V1 à V5. Elles sont activées par le calcium (liant le domaine C2), des phosphatidylsérines et du DAG ou des esters de phorbol (liants C1A et B). Les nPKC (nouvelles PKC comprenant les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , et  $\theta$ ) et les aPKC (PKC atypiques qui regroupent les isoformes  $\zeta$  et  $\iota/\lambda$ ) n'ont pas de domaine C2 et par conséquent ne sont pas dépendantes du calcium. (Cosentino-Gomes et al., 2012) (Figure 69)

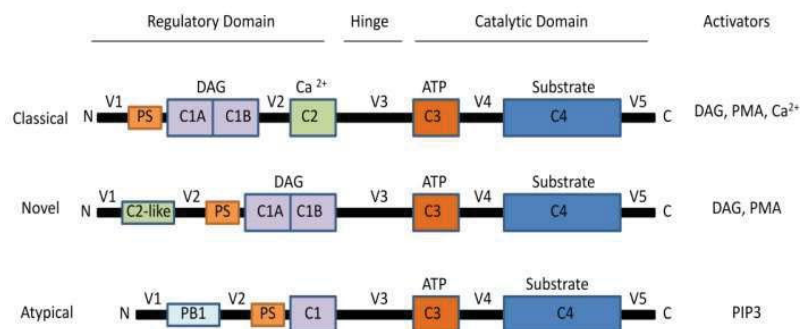


Figure 69 : Structure des PKC. (Cosentino-Gomes et al., 2012)



Les PKC activées par fixation de leurs ligands spécifiques, qui permettent le dépliement de la protéine, peuvent alors effectuer leur activité kinase. Elles vont avoir un rôle dans la modulation de canaux calciques comme les PMCA, de voies de signalisation comme MAPK ainsi que dans la transcription ou la contraction musculaire. (Landry et Gies, 2003) (Figure 70)

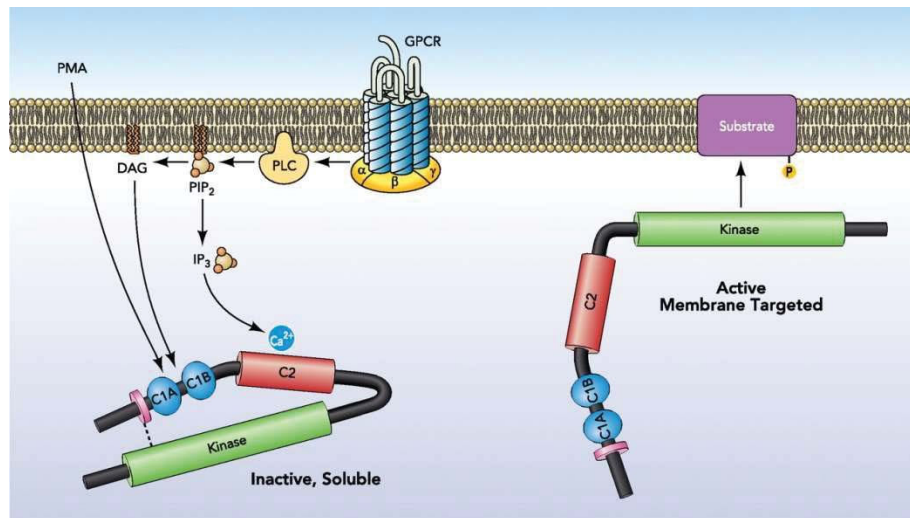


Figure 70 : Activation des cPKC. (Steinberg, 2012)

Cet aperçu, non exhaustif, du calcium toolkit permet de mettre en évidence la diversité des acteurs de la signalisation calcique. Le calcium toolkit est impliqué dans les grands processus de mort et de vie de la cellule, telles que l'apoptose, l'autophagie ou la prolifération. Par ailleurs, le remodelage de ce calcium toolkit est un phénomène fréquemment observé au cours de la cancérogenèse.

## 2. Le calcium, un second messager versatile mais au signal spécifique

Bien que cet ion soit un second messager impliqué dans la plupart des mécanismes cellulaires, sa concentration est finement régulée et aboutit à la formation d'un signal calcique spécifique. En effet, le signal calcique peut être modulé en amplitude et en fréquence (signal «AM-FM» - modulation amplitude - modulation fréquence) et aura des répercussions également différentes en fonction de la localisation du signal calcique et de la quantité de calcium impliquée.

Un signal calcique peut en effet être local ou se propager au-delà de la cellule émettrice et engendrera alors un processus spécifique dans une cellule ou une réponse coordonnée d'un ensemble de cellules. Ainsi, une faible induction d'un l'IP3R ou d'un RYR n'induirait qu'une réponse

individuelle du canal. Un signal un peu plus important induira une réponse d'un groupement de canaux IP3R ou RYR. Ces faibles stimulations seront impliquées dans des événements tels que la formation d'ATP ou le relargage de vésicules dans les fentes synaptiques. Des stimulations plus importantes pourront créer des vagues calciques intracellulaires liées à l'ouverture coordonnée de différents groupements de canaux permettant alors la transcription de gènes ou le contrôle de l'excitabilité neuronale. Enfin, le signal calcique peut se propager de cellule en cellule en créant des vagues calciques extracellulaires impliquées par exemple dans le processus de battements coordonnés des cils bronchiques. (Berridge et al., 2000) (Figure 71)

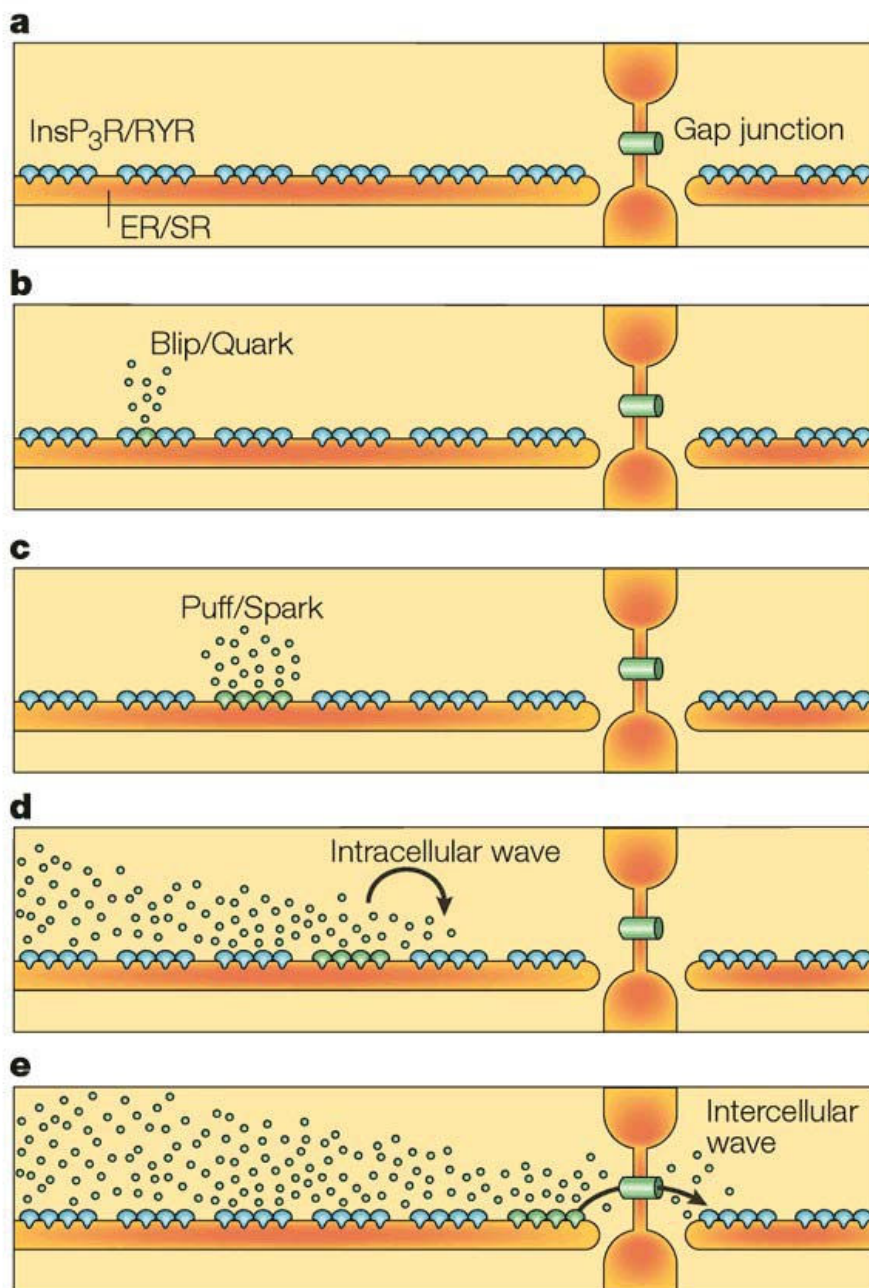


Figure 71 : Organisation spatiale du relargage de calcium des compartiments intracellulaires. (Berridge et al., 2000)

La localisation du signal calcique n'impactera pas la cellule de la même manière. En effet un signal calcique cytosolique très localisé et transitoire situé à une extrémité de la cellule, influencera la direction de la migration de cette cellule. (Wei et al., 2009) (Figure 72)

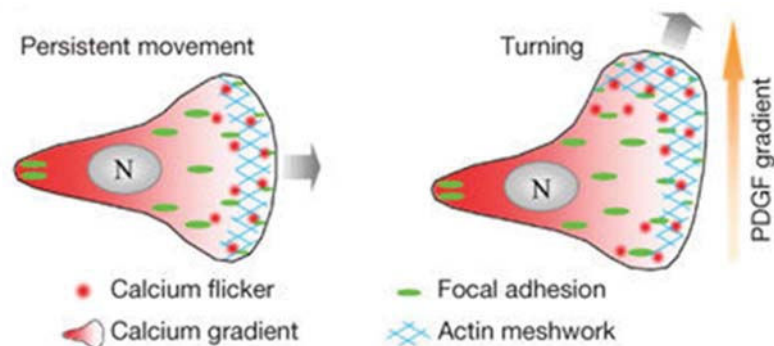
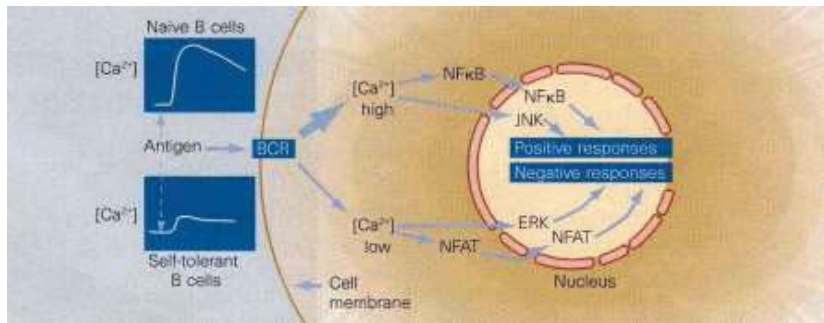


Figure 72 : Les signaux calciques brefs et localisés entraînent la direction de la migration de la cellule. (Wei et al., 2009)

Par ailleurs, les très hauts niveaux de calcium retrouvés proche des canaux après leur ouverture, peuvent spécifiquement réguler les voies de transcription. Par exemple, dans les neurones, la CaM se liera au calcium après ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L  $Ca_v1$  et ira promouvoir la phosphorylation de CREB et la transcription. (Ma et al., 2014) Le facteur de transcription NFAT1 (Nuclear Factor of Activated T cells 1) est activé seulement en réponse à une augmentation calcique due à l'ouverture du canal Orai1. Au contraire, l'activation d'NFAT4 requerra en plus une augmentation calcique nucléaire. (Kar and Parekh, 2015) (Monteith et al., 2017)

L'amplitude du signal calcique influence également le devenir cellulaire. En effet, il a été montré que la fixation d'un antigène sur le récepteur BCR (B-cell receptor) au niveau d'un lymphocyte B naïf induira un signal calcique de grande amplitude qui activera le facteur de transcription NF $\kappa$ B et engendrera alors le processus de sélection et la prolifération cellulaire. Au contraire, un lymphocyte ayant déjà répondu à la stimulation par la fixation de cet antigène sur son récepteur, et qui est donc devenu tolérant, ne produira qu'un signal de faible amplitude qui sera insuffisant pour induire la prolifération. Ceci provoquera l'activation du facteur de transcription NFAT et induira une sélection négative en bloquant sa différenciation en cellule plasmocytaire et la sécrétion d'anticorps. Un stimulus sur un même récepteur peut donc engendrer deux signaux calciques d'amplitude différente et donc 2 réponses opposées. (Berridge, 1997) (Figure 73)



**Figure 73 : Différence de réponses d'un lymphocyte B à la stimulation du même récepteur par un antigène. (Berridge, 1997)**

Par ailleurs, Tomida *et al.* ont étudié l'importance de la fréquence des oscillations calciques, dans le processus de prolifération des lymphocytes T dépendants du NFAT dans le noyau. Ce facteur de transcription doit être déphosphorylé pour permettre son passage dans le noyau puis est rephosphorylé. Tomida a montré qu'un signal calcique induit une déphosphorylation rapide de NFAT alors que son passage dans le noyau et sa phosphorylation sont des processus lents. Dans ce contexte, un signal calcique oscillatoire de faible fréquence permet une phosphorylation qui ne durera que quelques minutes et n'engendrera qu'un faible passage de NFAT dans le noyau, du fait d'une re-phosphorylation entre chaque oscillation. Au contraire, un signal oscillatoire de forte fréquence induira une déphosphorylation de NFAT en continu sans retour à l'état de base et ainsi une translocation continue et en forte quantité dans le noyau. Cette dernière perdurera même après l'arrêt de la stimulation calcique, du fait du temps nécessaire à la re-phosphorylation. Ce dernier exemple met en évidence un fonctionnement de mémoire du signal calcique. (Tomida et al., 2003)

Les quantités de calcium libre dans le RE peuvent, elles aussi, entraîner un stress cellulaire et la sensibilité aux stimuli apoptotiques, ce qui induirait alors une sortie de calcium de cet organe cellulaire. Au contraire, le transfert direct de calcium du RE vers la mitochondrie peut, quand il est diminué, induire l'autophagie et la mort dans certaines cellules cancéreuses. (Cardenas et al., 2016) (Monteith et al., 2017)

Au niveau de la mitochondrie, un signal calcique d'amplitude modérée peut promouvoir le métabolisme énergétique et la synthèse d'ATP alors qu'une augmentation de forte amplitude et prolongée pourrait promouvoir une surcharge calcique mitochondriale et ainsi la mort cellulaire. (Vervliet et al., 2016) (Ce phénomène sera développé dans la partie «Calcium et contrôle de l'apoptose»). Ainsi au niveau des organites de stockage, les différences d'amplitude et de fréquence vont également être traduites en réponse modulant le devenir de la cellule. (Monteith et al., 2017) (Figure 74)

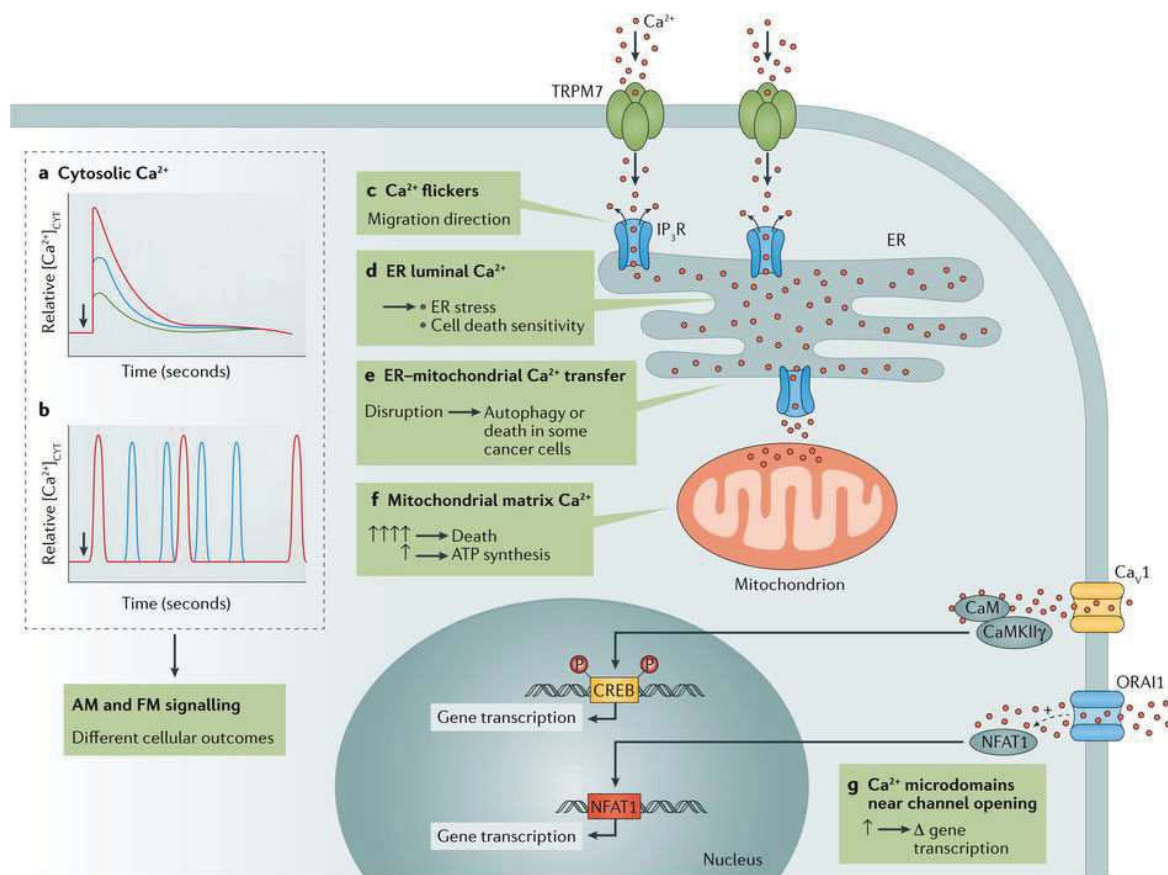


Figure 74 : Diversité du signal calcique. (Montheith et al., 2017)

### 3. Calcium et contrôle de l'apoptose

Le calcium est un élément indispensable au déclenchement et au déroulement de la mort cellulaire par apoptose.

Dans un premier temps, il a été observé dans des thymocytes que l'augmentation soudaine de calcium cytosolique induisait l'activité des endonucléases. Il a ensuite été montré que l'utilisation de glycosides cardiaques, qui, en bloquant la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase provoque une augmentation cytoplasmique de calcium et permet le déclenchement de l'apoptose dans des cellules cancéreuses prostatiques. (McConkey et al., 2000) (McConkey et al., 1989) L'étude des flux calciques pendant le processus apoptotique a permis de confirmer l'importance du calcium dans l'initiation de l'apoptose induite par les UV ou le  $\text{TNF-}\alpha$  dans la lignée cellulaire Hela. En effet, une série de pics calciques répétitifs est observée juste avant la sortie du cytochrome c de la mitochondrie et la chélation du calcium par le BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) empêche la sortie de cytochrome c et la mort. (Pu et al., 2002)

L'augmentation de calcium cytoplasmique nécessaire à la mise en place de l'apoptose peut être liée à l'activation de l'entrée de calcium capacitive. En effet, une étude a mis en évidence qu'un traitement

de neurones de rats avec une forte concentration de glucose est capable d'induire l'apoptose et est corrélé à une surexpression de STIM1. L'inhibition de STIM1 permet alors de protéger les cellules de l'induction de l'apoptose. (Xu et al., 2016)

La quantité de calcium à l'intérieur des organites joue également un rôle dans l'induction de l'apoptose. Ainsi, l'activation des RyR dans des cellules ovariennes d'hamster chinois par la caféine ou la Ryanodine entraîne une déplétion du RE et l'induction de l'apoptose. (Pan et al., 2000) De plus, l'accumulation du calcium au niveau de la mitochondrie permet alors l'abolition du potentiel de membrane de cet organe et induit l'apoptose.

Dans ce contexte, les membres de la famille Bcl-2 interviennent dans le contrôle de la libération du calcium du RE, et dans son entrée dans la mitochondrie ; ils permettent alors de contribuer à l'induction ou à l'inhibition de l'apoptose. Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 explicités grâce au schéma ci-dessous. (Figure 75)

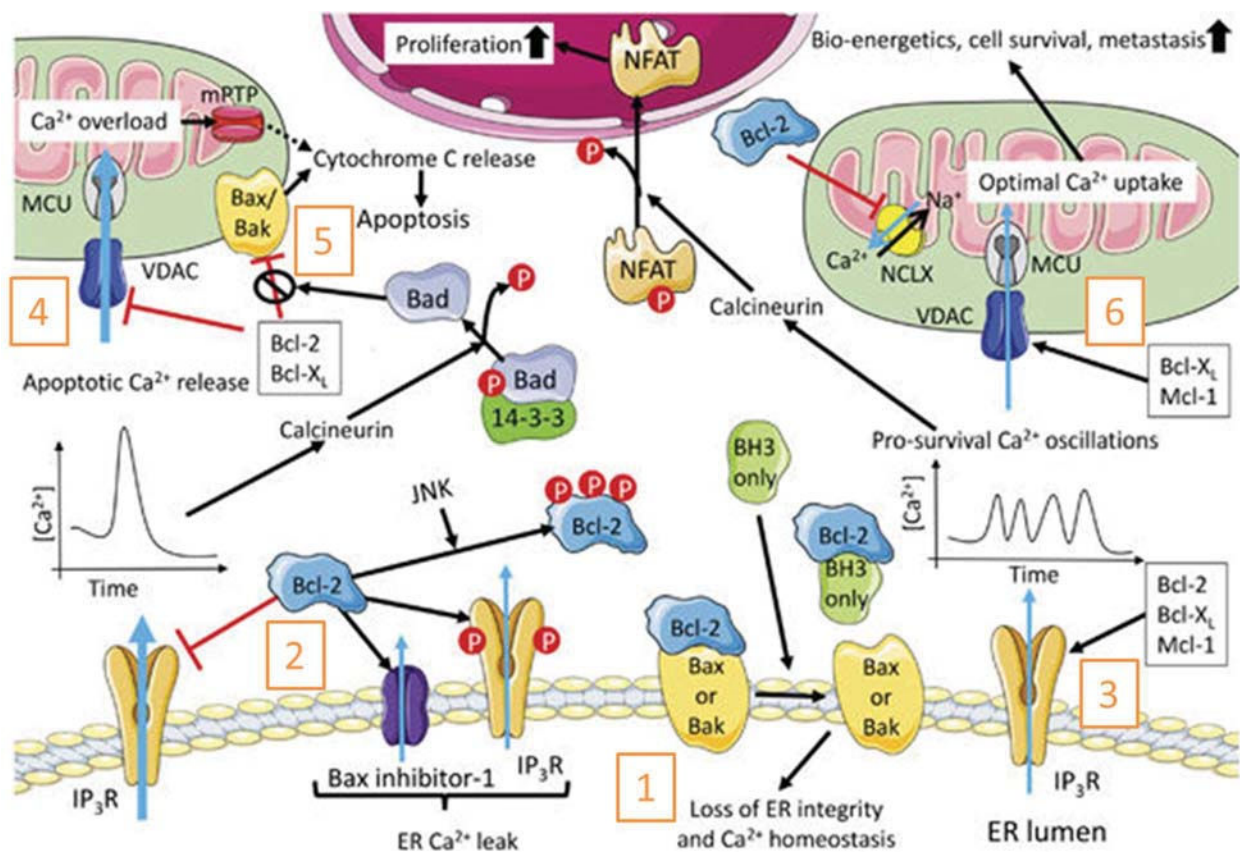


Figure 75 : Vue d'ensemble de la régulation du calcium intracellulaire par les protéines de la famille Bcl-2 dans les processus de mort cellulaire et de survie. (Vervliet et al., 2016)

Cette figure dépeint les réseaux moléculaires complexes des interactions entre les membres de la famille Bcl-2 et la signalisation calcique intracellulaire dans les processus de mort et de survie cellulaire.

#### Implication des membres de la famille Bcl-2 au niveau du RE :

1. Les membres de la famille Bcl-2 contrôlent l'organisation et/ou la dynamique du RE. Ainsi, lorsque Bax ou Bak sont libérés de Bcl-2 au niveau du RE, ils s'oligomérisent induisant alors la formation de pores permettant le relargage du calcium dans le cytosol. (Vervliet et al., 2016)
2. Bcl-2 est capable d'inhiber directement le relargage de calcium du RE en se fixant à la région centrale du domaine modulateur des IP3R *via* son domaine BH4. (Rong et al., 2009) Par ailleurs, Bcl-2 est impliqué dans l'induction de fuites de calcium du RE à l'état basal, ce qui empêchera un relargage massif du calcium pro-apoptotique et donc la surcharge calcique mitochondriale. Deux mécanismes ont été identifiés comme responsables de ce phénomène. Premièrement, Bcl-2 peut promouvoir les fuites de calcium en se fixant à Bax inhibitor-1, qui, en s'oligomérisant, agit comme un antiporteur  $Ca^{2+}/H^{+}$  permettant la sortie de calcium du RE. Deuxièmement Bcl-2 peut induire des fuites calciques des canaux IP3R1 par un mécanisme impliquant la phosphorylation de ces derniers par la PKA. (Ahn et al., 2010) (Vervliet et al., 2016) Cet effet est inhibé après phosphorylation de Bcl-2 par JNK.
3. Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub> peuvent également se fixer au niveau de la région C-terminale des IP3R ce qui sensibilise ces récepteurs à de faibles concentrations d'IP3 et induit des oscillations calciques. Ces phénomènes oscillatoires sont capables d'activer par exemple la calcineurine et le facteur de transcription NFAT promouvant alors la prolifération cellulaire comme nous l'avons vu précédemment. (Vervliet et al., 2016) (Monaco et al., 2012) (Vervliet et al., 2016)

#### Implication des membres de la famille Bcl-2 au niveau de la mitochondrie :

4. Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> inhibent également la surcharge calcique mitochondriale en inhibant l'entrée de calcium par le VDAC1. (Shimizu et al., 2000) (Arbel et al., 2012)
5. L'oligomérisation de Bax et Bak sur la membrane mitochondriale va permettre d'activer le PTP. Des signaux calciques peuvent aussi activer la calcineurine qui déphosphoryle Bad, causant sa désequestration par les protéines 14-3-3. Bad déphosphorylé peut alors lier Bcl-x<sub>L</sub> et bloquer ses propriétés anti-apoptotiques. Il en résulte alors l'activation de Bax et Bak, leur oligomérisation et l'apoptose.
6. Dans des conditions cellulaires physiologiques, Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> facilitent l'entrée du calcium au niveau de la mitochondrie *via* le VDAC1 (et VDAC3) ce qui active la production d'ATP *via* le cycle de Krebs. (Michels et al., 2013) (Huang et al., 2014) (Michels et al., 2013) Par ailleurs, Mcl-1 en se fixant au VDAC1 engendre une entrée de calcium mitochondriale et la formation de ROS induisant la migration cellulaire. (Huang et al., 2014)

## Calcium et autres molécules impliquées dans l'apoptose

L'augmentation du calcium cytoplasmique est connue pour activer la calpaïne et la calcineurine ce qui renforce le processus apoptotique. En effet, la calpaïne, molécule possédant des domaines EF-hand peut, par clivage, activer Bax et Bid ainsi qu'inhiber les XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) ou les inhibiteurs de la calcineurine cain/cabin1. L'inhibition des XIAP permettra alors le clivage de la caspase 6 par les caspases 9 par exemple et l'induction de l'apoptose. (Chen et al., 2001) (Kobayashi et al., 2002) (Wood and Newcomb, 2000) (Kim et al., 2002) (Figure 76)

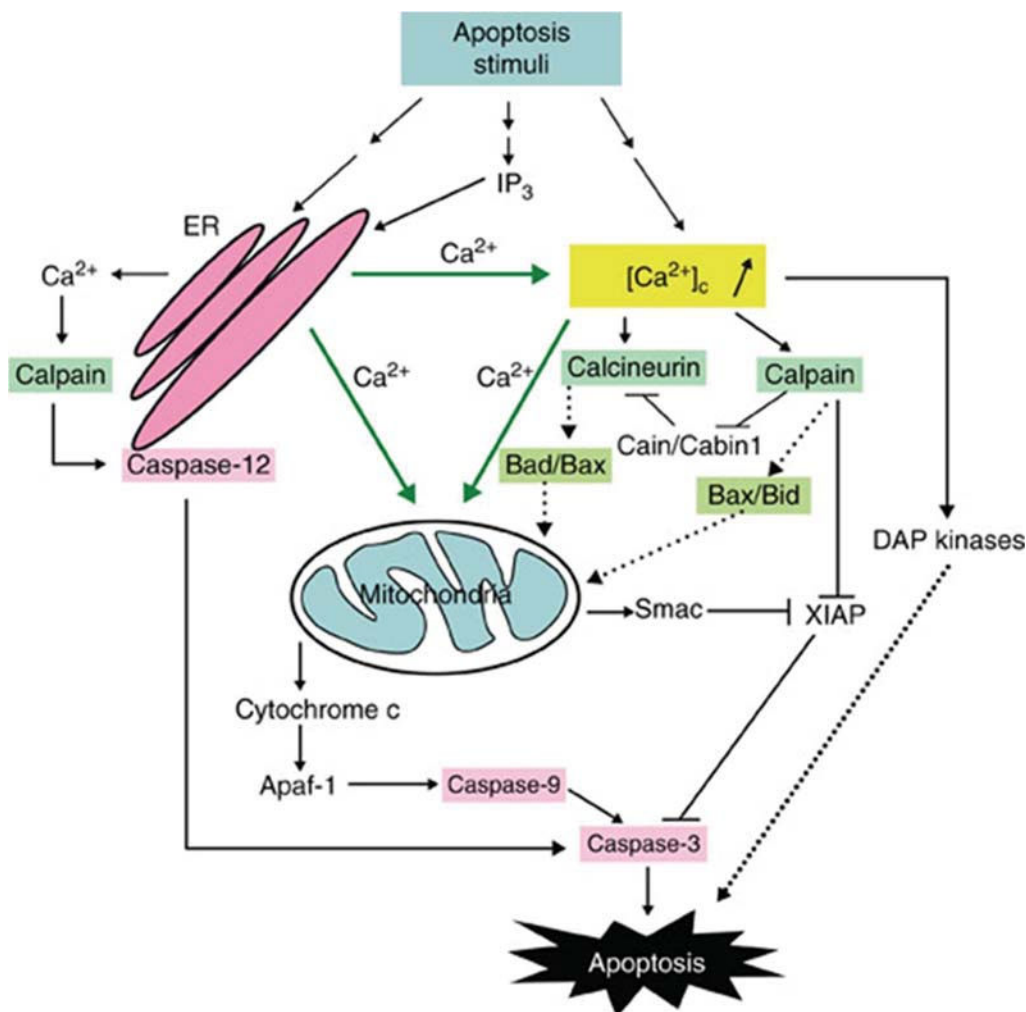


Figure 76 : Progression de l'apoptose par différents mécanismes régulés par le calcium (Guo et al., 2009).

Suite à un stimulus apoptotique, une augmentation de calcium libre est générée dans le cytosol *via* un relargage du calcium du RE ou *via* un influx du milieu extracellulaire. Cet excès de calcium peut se lier à des enzymes dépendantes de cet ion comme la calpaïne et la calcineurine et peut activer les cibles en aval incluant les membres de la famille Bcl-2. Par ailleurs, le relargage du calcium pourrait être directement capté par la mitochondrie et l'excès de calcium pourrait entraîner des dysfonctions mitochondriales.



## 4. Calcium et autophagie

Comme brièvement évoqué précédemment, l'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage des composants de la cellule lui permettant ainsi de lutter contre certains stress et infections et de maintenir ses niveaux énergétiques et processus anaboliques dans les périodes de sevrage. (Lum et al., 2005) Cependant, lorsque ce processus devient excessif, il conduit les cellules à la mort. Liu *et al.*, ont d'ailleurs décrit l'autosis en 2013, comme étant une mort cellulaire induite par une autophagie prolongée que nous verrons par la suite. (Liu et al., 2013)

De manière générale, l'autophagie se déroule en plusieurs étapes :

**La nucléation** : Elle consiste en l'assemblage de différentes protéines nécessaires à l'initiation de ce processus. Lors de l'initiation de l'autophagie, les kinases ULK, la PI3K de classe III VPS34 (vacuolar protein sorting 34) s'associent avec différents facteurs tels que le BH3-only Beclin-1 (marqueur déterminant de l'autophagie), UVRAG (Ultraviolet irradiation resistance-associated gene), AMBRA (Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy), BIF-1 et des protéines ATG (autophagy-related genes), telles qu'ATG14.

**L'élongation** : permet la formation, à partir d'un morceau de membrane, d'une structure appelée phagophore, au niveau de laquelle les protéines et organites à dégrader viennent s'agréger. D'un point de vue moléculaire, phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) produit par VPS34 s'agrège à la membrane destinée à former le phagophore et recrute d'autres protéines pour permettre l'élongation de cette structure. Lors de cette étape, LC3 I (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, également appelée ATG8) cytoplasmique forme un complexe avec la phosphatidyléthanolamine que l'on nomme LC3 II, marqueur majeur de l'autophagie, qui se lie au phagophore en même temps que différentes protéines ATG comme ATG5 et ATG7. Cette protéine a un rôle structural dans l'élongation du phagophore.

Lorsque les deux extrémités de ce phagophore s'agrègent, la vésicule formée est appelée **autophagosome**.

Celle-ci fusionne alors avec un lysosome, pour donner un **autolysosome**, structure réalisant la dégradation et le recyclage des composants cellulaires qu'elle renferme.

Des protéines adaptatrices telles que p62 (SQSTM1 ou sequestosome 1), second marqueur majeur de l'autophagie, participent à identifier et à intégrer à ces vacuoles d'autophagie les protéines agrégées, malformées et les organites endommagés, pour permettre leur dégradation. (Cicchini et al., 2015) (Figure 77)

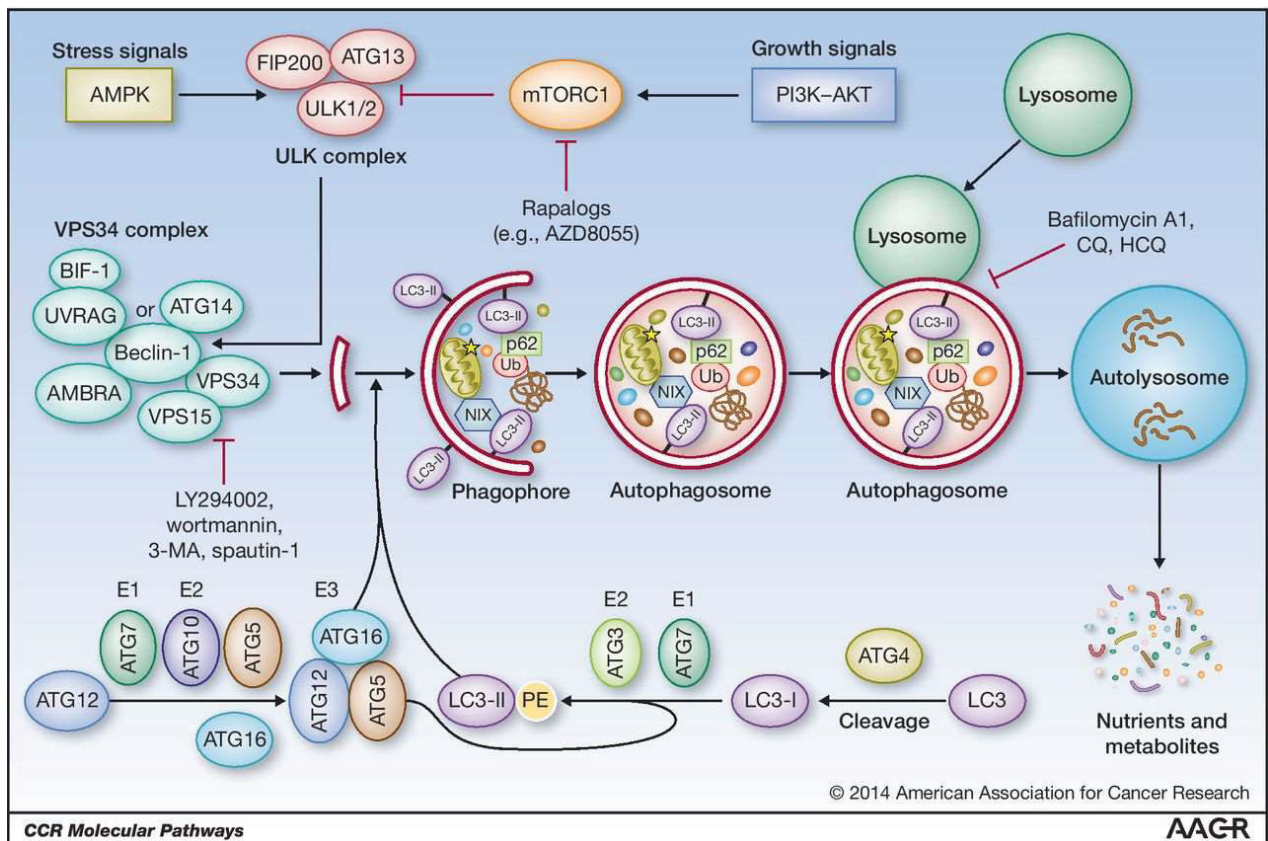


Figure 77 : Schéma du processus autophagique. (Cicchini et al., 2015)

L'autophagie est induite par un manque de nutriments, d'acides aminés ou de facteurs de croissance mais également par un stress ou des substances pharmacologiques comme les rapalogues (par exemple la rapamycine) et l'AZD8055 ainsi que l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui vont alors avoir un rôle clé dans l'initiation de ce phénomène : inhiber mTORC1. Ce complexe est en effet un inhibiteur majeur de l'autophagie lorsqu'il est actif et son inhibition empêche la phosphorylation inhibitrice de ULK1 permettant alors sa participation à la nucléation, étape d'induction de l'autophagie. (Figure 78)

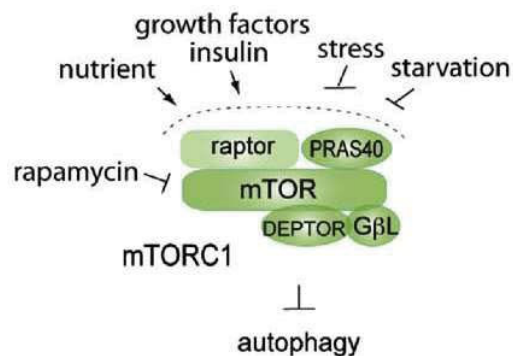


Figure 78 : L'inhibition de mTORC1 permet d'induire l'autophagie. (Jung et al., 2010)

L'autophagie peut être inhibée à différentes étapes. En effet, la wortmannin ou le 3-méthyl-adénine (3-MA) sont des inhibiteurs des PI3K. Ils empêchent alors l'action de VPS34 et inhibent la formation du phagophore. La bafilomycine A1 ou la chloroquine (CQ), eux, inhibent la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. (Cicchini et al., 2015)

De nombreuses études portent sur l'implication du calcium dans le processus autophagique. Cependant, son rôle pro-autophagique ou anti-autophagique reste encore à déterminer. Le schéma suivant, commenté ci-dessous, met en évidence l'implication du calcium au cours du processus autophagique.

### Le calcium, un inducteur de l'autophagie

1. Dans de nombreuses études, le calcium a été décrit comme un inducteur de l'autophagie. En effet, une étude effectuée dans des hépatocytes murins immortalisés suggère que l'augmentation cytosolique de calcium active la CamKK $\beta$  et l'AMPK en aval. (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007). Ces mécanismes moléculaires ont également été observés dans des cellules MCF-7 sevrées en acides aminés. (Ghislat et al., 2012) (Figure 79)

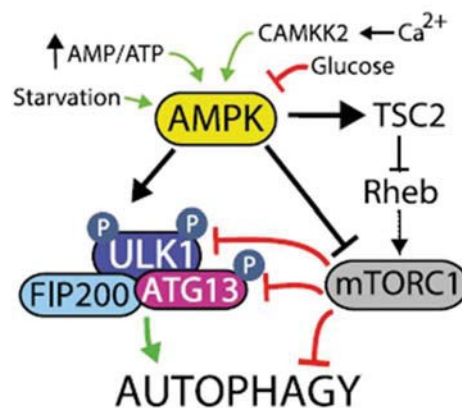


Figure 79 : Le calcium induit l'AMPK via la CamKK2, ce qui permet l'inhibition de mTOR et l'induction de l'autophagie. (Filippi-Chiela et al., 2016)

2. La chélation du calcium par le BAPTA-AM réduit le nombre basal d'autophagosomes dans les cellules non sevrées et empêche la formation de nouveaux autophagosomes lorsqu'un stimulus autophagique apparaît. Le calcium est également impliqué dans l'accumulation d'ATG18 à la membrane des phagophores naissants. (Pfisterer et al., 2011)

3. De plus, il a été montré que le calcium participe à la fusion des endosomes ou des autophagosomes avec les lysosomes. (Pryor et al., 2000)

4. Enfin, le lien entre le calcium et la protéine Beclin-1 joue également un rôle fondamental dans les processus autophagiques. Ainsi, ce BH3-only est capable de se lier au niveau de l'extrémité N-terminale des IP3R ce qui libère du calcium et active les phénomènes autophagiques en réponse à un sevrage cellulaire. (Decuyper et al., 2012) Ce processus est contrôlé par Bcl-2 qui, en séquestrant Beclin-1 *via* leur domaine d'interaction BH3, est capable d'inhiber l'autophagie. Cette interaction peut être elle-même inhibée par la phosphorylation de Bcl-2 par une kinase activée par la CaM, la Death Associated Protein Kinase (DAPK). (Wei et al., 2008) (Zalckvar et al., 2009)

#### Le calcium inhibiteur de l'autophagie

D'autres arguments montrent au contraire que le calcium serait capable d'inhiber l'autophagie.

5. La capture du calcium par la mitochondrie semble être requise pour empêcher l'autophagie activée par l'AMPK. En effet, le calcium est nécessaire au fonctionnement de plusieurs enzymes du cycle de Krebs ainsi que pour la phosphorylation oxydative. L'augmentation du métabolisme mitochondrial permet alors la production d'ATP. Une inhibition de l'entrée de calcium pourrait alors provoquer une crise énergétique dans la cellule et activer l'autophagie. (Murphy et al., 1990) (Bootman et al., 2017) Il a par ailleurs été mis en évidence que l'inhibition des IP3R engendre une inhibition du transport du calcium du RE à la mitochondrie et une autophagie mTOR indépendante liée à la réduction de la production d'ATP. (Cicchini et al., 2015) (Cockcroft, 2006) (Criollo et al., 2007)

6. De plus, il a été démontré qu'un flux de calcium provenant du RE induit par la thapsigargine permet l'inhibition de la formation des autophagosomes dans les lignées cellulaires LNCaP et U2OS ou le passage du stade autophagosome à autolysosome dans une lignée de cellules MEF. (Engedal et al., 2013) (Ganley et al., 2011) L'inhibition de l'entrée capacitive calcique peut également entraîner l'autophagie. Ainsi, l'inhibition des SOCE désactive la voie CamKII $\gamma$ /Akt/mTOR dans des cellules cancéreuses colorectales. (Jing et al., 2016) Une autre étude a montré que l'inhibition de STIM1 par le resveratrol active l'AMPK et inhibe la voie Akt/m-TOR dans des lignées de cellules cancéreuses prostatiques. (Selvaraj et al., 2016) Enfin, l'induction d'un stress oxydatif dans des cellules PC3 et Hela induit l'activation de TRPM2 ce qui active la CaMKII. Cette dernière, en phosphorylant Beclin-1, augmente son interaction avec Bcl-2 et inhibe l'autophagie. (Wang et al., 2016) (Figure 80)

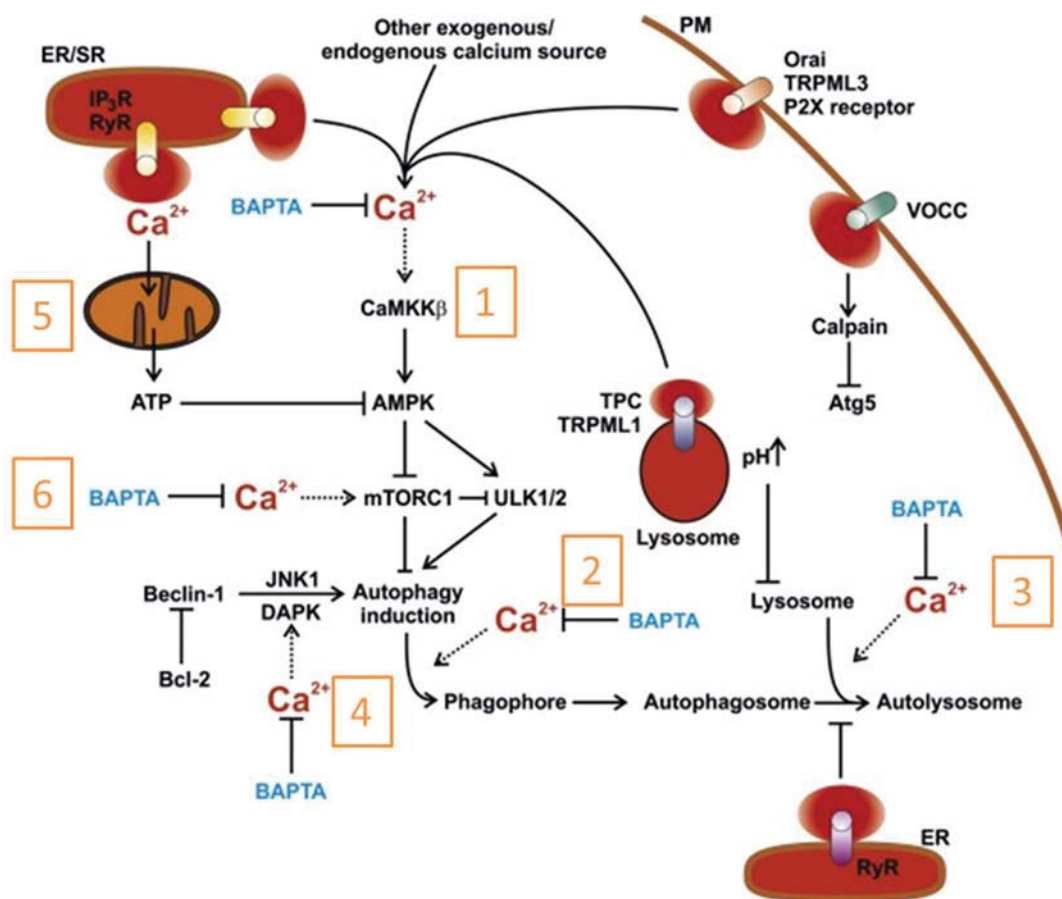


Figure 80 : Illustration de plusieurs possibilités proposées pour lesquelles le calcium est capable de réguler l'induction et la progression de l'autophagie. Cette illustration montre plusieurs aspects de la voie canonique de l'autophagie, incluant le processus de formation de l'autophagosome et indique les sites qui pourraient être régulés par le calcium. La plupart des étapes régulées par le calcium ont été suggérées après leur inhibition par le BAPTA-AM et les caractéristiques de plusieurs de ces signaux calciques sont inconnus. (TPC : Two-Pore Channel)

L'ensemble de ces arguments mettent en lumière l'implication du calcium dans l'autophagie. Cependant, de nouvelles recherches seront nécessaires pour préciser son rôle dans ce processus, qui varie probablement en fonction de sa source, de la diversité des signaux et du modèle cellulaire. (Bootman et al., 2017)

Ainsi, une autophagie basale a lieu dans les cellules en condition physiologique et permet le recyclage du matériel cellulaire. Elle peut être également induite par différents facteurs tels que le manque de nutriments, induisant alors un processus de survie des cellules. Dans ce cadre, Cardenas a montré qu'une inhibition de calcium induit l'autophagie dans des cellules non cancéreuses alors qu'il provoque la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses, du fait de leurs besoins accrus en molécules énergétiques synthétisées au niveau mitochondrial par le cycle de Krebs. Ces travaux montrent une addiction des cellules tumorales au transfert de calcium du RE à la mitochondrie. (Cardenas et al., 2016)

## 5. Calcium et métabolisme énergétique

Au sein de la cellule, la synthèse de molécules énergétiques est réalisée par trois grandes voies : la glycolyse au niveau du cytosol, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie en condition aérobie.

La glycolyse permet par une succession de réactions enzymatiques de transformer une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate. Au cours de cette transformation, sont générées deux molécules d'ATP et deux molécules de coenzyme réduit NADH. Cette voie métabolique ne nécessite pas la présence d'oxygène pour fonctionner. (Berg et al., 2002) (Glancy and Balaban, 2012) (Figure 81)

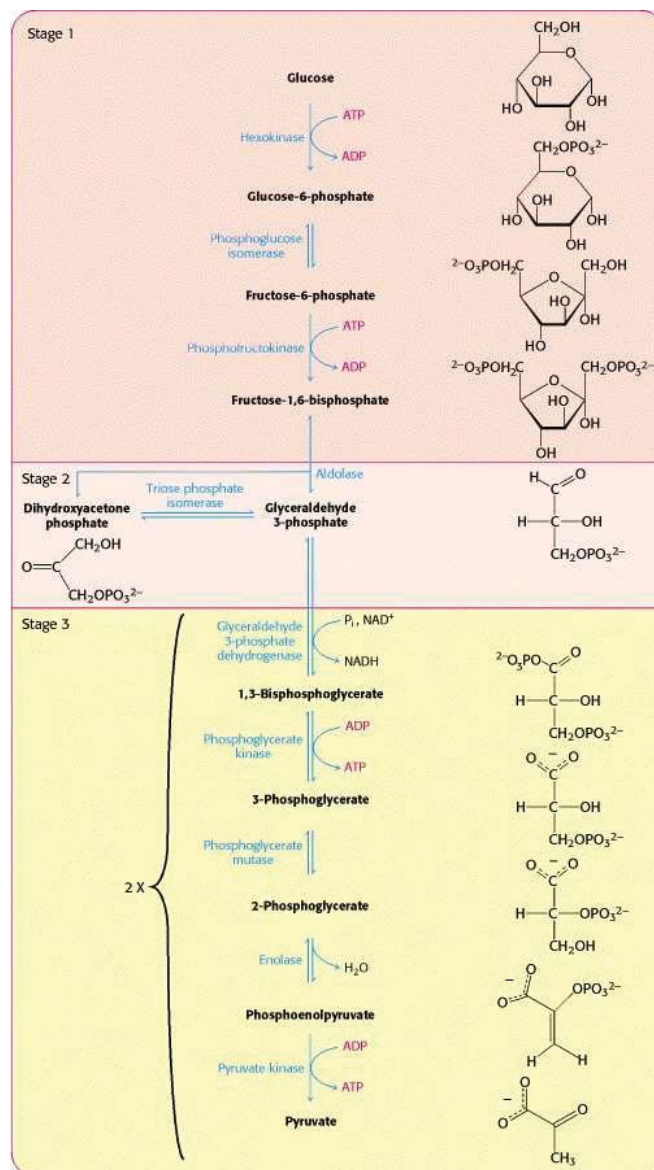


Figure 81 : Schéma de la glycolyse. (Berg et al., 2002)

En aérobose, le pyruvate synthétisé va être transféré à la mitochondrie et transformé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA). Cette transformation consiste en une décarboxylation oxydative et fait intervenir un complexe de trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase dépendante du calcium, la dihydrolipoamide S-acétyltransférase et la dihydrolipoyl déshydrogénase. Au cours de cette réaction, une molécule de NADH et une molécule de CO<sub>2</sub> sont produites.

Une fois l'acétylCoA formé, il entre dans le cycle de Krebs, qui permet la synthèse de nombreux coenzymes réduits : 3 NADH et 1 FADH<sub>2</sub> nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Deux enzymes dépendantes du calcium participent à cet enchaînement réactionnel : l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase (Kalyanaraman, 2017) (Glancy and Balaban, 2012) Les coenzymes réduits entrent dans la chaîne respiratoire mitochondriale où ils seront oxydés pour permettre la production massive de molécules énergétiques. (Figure 82)

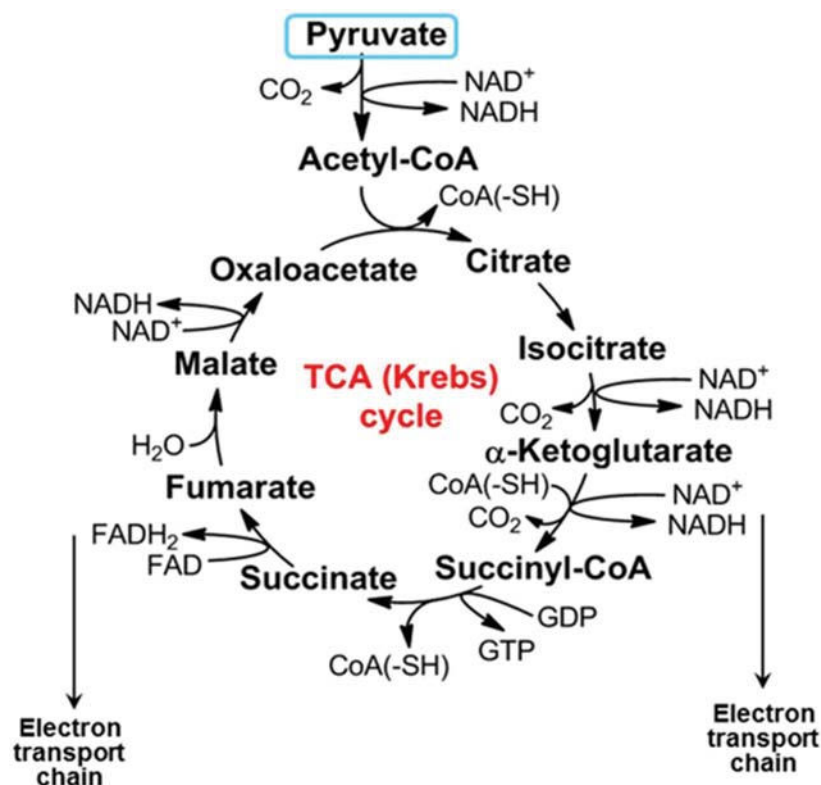


Figure 82 : Schéma du cycle de krebs. (Kalyanaraman et al., 2017)

La chaîne respiratoire mitochondriale est une chaîne de transport d'électrons qui permet la mise en place d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ces électrons proviennent de l'oxydation des coenzymes réduits au niveau du cycle de Krebs. Elle se compose de quatre complexes situés au niveau des crêtes mitochondriales.

Le complexe I, composé de la NADH déshydrogénase, réalise la réaction de réduction du coenzyme Q<sub>10</sub> (ubiquinone de la membrane interne) grâce à deux électrons du NADH. Ce complexe est inhibé par la roténone qui bloque le transport des électrons avant son arrivée au coenzyme Q<sub>10</sub>.

Le complexe II fait intervenir la succinate deshydrogénase, enzyme également présente dans le cycle de Krebs. Elle oxyde le succinate en fumarate et réduit le coenzyme Q<sub>10</sub>. Elle est inhibée par deux molécules: le malonate ou l'oxaloacétate.

Le complexe III est composé du coenzyme Q-cytochrome c réductase qui oxyde une molécule d'ubiquinol et réduit deux molécules de cytochrome c. Ce complexe est inhibé par l'antimycine.

Au niveau du complexe IV, la cytochrome c réductase permet l'oxydation du cytochrome c par une molécule d'oxygène, la formation de 2 molécules d'eau et la sortie de 4 protons au niveau de l'espace inter-membranaire. Il est inhibé par le cyanure ou encore le monoxyde de carbone qui se lie avec une meilleure affinité que l'oxygène au cytochrome c réductase, inhibant alors la réduction de l'oxygène. (Figure 83)

Enfin, l'ATP synthétase pouvant être considéré comme le complexe V, induit la phosphorylation d'ADP en ATP grâce au passage de protons accumulés dans l'espace inter-membranaire, vers la matrice mitochondriale. (Kalyanaraman, 2017) L'ensemble de ces trois réactions fournit alors en conditions optimales 38 ATP.

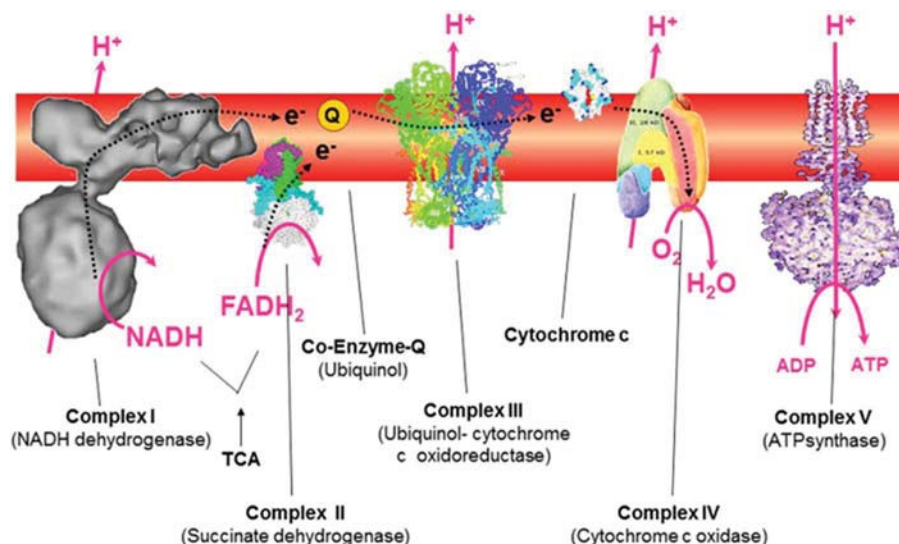


Figure 83 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Kalyanaraman et al., 2017)



En condition hypoxique, les cellules entrent dans un métabolisme qui n'utilise plus le cycle de Krebs ni la chaîne respiratoire mitochondriale qui requièrent de l'oxygène pour fournir leur énergie. Le glucose sera transformé en pyruvate qui sera alors métabolisé en lactate, c'est la fermentation lactique. L'expulsion du lactate hors de la cellule acidifie ainsi le pH extracellulaire.

Les cellules cancéreuses, en prolifération continue, ont des besoins énergétiques importants. Elles consomment en effet dix à quinze fois plus de glucose que les cellules saines. Des dérégulations liées à des mutations au niveau des acteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale ou un découplage du gradient de protons au niveau de la membrane interne mitochondriale peuvent entraîner l'utilisation de la glycolyse comme source majoritaire d'énergie, même en condition aérobie. C'est l'effet Warburg. (Icard and Lincet, 2013)

## 6. Calcium et cancérogenèse

### A. Remodelage de l'expression et de l'activité des canaux calciques dans les cancers

Il est connu depuis longtemps que l'expression et l'activité des canaux calciques sont modulées pendant la cancérogenèse. Cette modulation a pour but de permettre à la cellule d'augmenter son métabolisme et donc ses capacités de prolifération, de migration ou de résister à la mort cellulaire.

- Modulation de l'expression des canaux calciques dans les cancers :

Ces dérégulations peuvent être des surexpressions de ces canaux, des sous-expressions ou encore des modifications de leur activité. Nous allons donc évoquer chacune de ces possibilités. (Tableau 7)

Tableau 7 : Altération de l'expression des canaux/transporteurs/pompes dans les cancers. (Cui et al., 2017)

Channel/transporter	Cancer type	Changes
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> R1 Glioma	Decreased
	IP <sub>3</sub> R2 Lymphocytic leukemia	Increased
	IP <sub>3</sub> R3 Glioma, gastric, colon, head and neck cancer	Increased/Mutation
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	SERCA2 Colon cancer	Increased
	SERCA3 Gastric, lung, choroid plexus tumors, and in myeloid leukemia	Decreased
	SPCA1 Breast cancer	Increased
	SPCA2 Breast cancer	Increased
	PMCA1 Oral cancer	Decreased
	PMCA2 Breast cancer	mRNA elevated
	PMCA4 Colon cancer	Decreased
VGCC	Ca <sub>v</sub> 1.2 Colon and esophageal cancer	Increased
	Ca <sub>v</sub> 2.3 Glioma	Increased
	Ca <sub>v</sub> 3.1 Glioma	Increased
	Ca <sub>v</sub> 3.2 Prostate, ovarian, glioma, breast, esophageal, hepatoma, melanoma, and colon cancer	Increased
TRP	TRPC1 Breast cancer	Increased
	TRPC3 Ovarian and breast cancer	Increased
	TRPC6 Esophageal, glioma and breast cancer	Increased
	TRPM1 Melanoma	Decreased
	TRPM7 Pancreatic and breast cancer	Increased
	TRPM8 Pancreatic, prostate, bladder, breast, melanoma, colon and lung cancer	Increased
	TRPV1 Bladder and prostate cancer	Decreased/Increased
	TRPV2 Bladder, prostate cancer and hepatocarcinoma	Decreased/Increased
	TRPV4 Non-melanoma skin cancer, tumor endothelial cell derived prostate and breast cancer	Decreased
TRPV6 Breast, prostate, lung, thyroid, colon and ovarian cancer	Increased	
Orai & STIM	Orai1 Pancreatic adenocarcinoma, glioma, melanoma, breast, esophageal, renal, and NSCLC	Increased/Constitutive activated
	Orai3 Breast, prostate and lung cancer	Increased
	STIM1 Hepatoma, melanoma, cervical, colorectal cancer, breast and pancreatic adenocarcinoma	Increased
	STIM2 Breast, colorectal cancer and melanoma	Increased/Decreased
MCU	Breast, colon and prostate cancer	Decreased/Increased

Exemples de canaux sous-exprimés dans les cancers :

Il a été montré que l'expression des SERCA3 au niveau de cellules tumorales du côlon diminue progressivement au cours de la cancérogénèse, de l'apparition des polypes hyperplasiques jusqu'aux stades tardifs où l'on observe des cellules peu différenciées et dans lesquelles les SERCA sont absentes. (Brouland et al., 2005) Ceci a pour conséquence une diminution de l'entrée de calcium dans le RE et une augmentation de sa concentration dans le cytosol. La modulation des flux calciques, liée au changement d'expression d'un canal calcique, peut donc avoir lieu au début du

processus de cancérogénèse et s'accroître au cours de celui-ci. Elle peut alors refléter le stade du cancer. D'autres exemples corroborent cette étude. Ainsi, le canal calcique TRPV1 est progressivement sous exprimé dans les cancers de la vessie. Cependant, aucune conséquence fonctionnelle n'a été étudiée dans ces travaux. (Lazzeri et al., 2005). Enfin, une réduction de l'expression des IP3R1 a été également observée dans les cancers de la vessie résistants au cisplatine. Une surexpression de ces canaux permet alors de restaurer la chimiosensibilité, ce qui montre que la dérégulation de ces canaux peut être prédictive de la réponse au traitement. (Tsunoda et al., 2005)

Quelques études ont par ailleurs tenté de décrypter les mécanismes impliqués dans cette sous-expression. Ainsi, la diminution de l'expression des PMCA1 dans les cancers oraux dès l'apparition des lésions précancéreuses serait liée à une méthylation de l'ADN et aurait donc une origine épigénétique. (Saito et al., 2006). Par ailleurs, les modifications de l'expression des canaux calciques peuvent également résulter d'un changement de l'expression d'un miARN. En effet, la surexpression du miR-25 induit une sous-expression du MCU dans les cancers du côlon et l'inhibition de ce miARN sensibilise les cellules à l'apoptose. (Marchi et al., 2013) Cette sous-expression pourrait en effet, empêcher une augmentation de la concentration calcique mitochondriale nécessaire au déclenchement de l'apoptose.

#### Exemples de canaux sur-exprimés dans les cancers :

Alors que l'IP3R3 n'est pas exprimé dans les cellules colorectales normales, son expression est induite à la marge des tumeurs colorectales augmentant la capacité d'invasion et de métastase, et donc l'agressivité du cancer. (Shibao et al., 2010)

De plus, la surexpression des SERCA2 dans les cancers colorectaux est également corrélée au grade et au stade du cancer et à la capacité de la tumeur à induire des métastases. *In vitro*, l'inhibition de cette pompe conduit à une diminution de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses. (Fan et al., 2014)

Une étude a mis en évidence que les canaux calciques voltage-dépendants de type T Cav 3.2 sont souvent surexprimés dans les lignées cellulaires et cultures primaires de glioblastomes et dans toutes les cellules souches de glioblastome. Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic et l'inhibition de ces canaux par le Mibéfradil permet alors d'induire la mort cellulaire. (Zhang et al., 2017).

Enfin, les canaux calciques TRPC se retrouvent souvent surexprimés dans les cancers. Ainsi, les TRPV6 et TRPC3 sont surexprimés dans les cancers épithéliaux de l'ovaire par rapport à des tissus ovariens sains. (Yang et al., 2009). (Zhuang et al., 2002). L'extinction génique des TRPC3 a, par ailleurs, permis

de réduire la prolifération des lignées cellulaires *in vitro* et dans un modèle de tumeurs xéno greffées en sous-cutané. Enfin, il a été montré que les canaux TRPC1 et TRPM8 étaient fréquemment exprimés dans les cancers du sein bien différenciés et peu prolifératifs alors que TRPM7 était principalement exprimé dans les tissus de grade élevé. Par ailleurs, TRPV6 est fortement associé au caractère invasif du cancer et régule la migration et l'invasion. (Dhennin-Duthille et al., 2011)

Comme le montrent ces différents exemples, l'expression de ces canaux peut être dérégulée de manière analogue dans différents cancers. Par ailleurs, au sein d'un même type de cancers, l'expression de certains canaux peut être augmentée ou diminuée. Par exemple, l'expression des canaux TRPC6 est augmentée dans les cancers de l'œsophage, les gliomes et les cancers du sein. (Aydar et al., 2009) (Zhang et al., 2013) (Ding et al., 2010) Dans les cancers colorectaux, l'expression de SERCA2 est augmentée et celle de MCU inhibée. (Marchi et al., 2013) (Fan et al., 2014)

Ces modifications d'expression des canaux calciques, qui peuvent être des surexpressions ou des sous-expressions, sont donc fréquentes dans les cancers. Elles peuvent être prédictives du stade du cancer et participent à l'activation de processus oncogéniques.

Les variations de calcium au cours de la cancérogenèse peuvent également être perturbées par la modulation de l'activité des canaux calciques.

- Modulation de l'activité des canaux calciques dans les cancers :

Il a été mis en évidence qu'un épissage alternatif de STIM2 conduit à la formation d'une protéine inhibitrice de l'entrée capacitive de calcium. (Rana et al., 2015) Une autre étude a également montré qu'une augmentation de la concentration en acide arachidonique induisait un réarrangement des sous-unités Orai des canaux calciques capacitifs, favorisant la formation de canaux Orai1/Orai3 dans des cellules prostatiques cancéreuses. Ceci a pour conséquence une diminution de l'entrée capacitive de calcium dépendante de Stim1 et une augmentation de l'entrée de calcium dépendante de l'acide arachidonique permettant l'induction de la prolifération cellulaire. (Dubois et al., 2014)

Les dérégulations des canaux calciques sont donc nombreuses, peuvent être différentes ou communes dans un type de cancers ou dans des cancers différents et sont impliquées dans la mise en place de « hallmarks » particulières du cancer. Il est alors nécessaire de connaître précisément le ou les canaux dérégulés dans le cancer à traiter, ce qui pourra permettre la mise en place d'une thérapie visant à réguler spécifiquement le flux altéré et de restaurer un fonctionnement cellulaire normal.

## B. Remodelage de l'expression des molécules effectrices du calcium dans les cancers

La surexpression de la PLC $\gamma$ 1 favorise le développement de métastases à distance chez des patientes atteintes de cancers du sein non invasifs recevant une chimiothérapie néoadjuvante. Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic. (Lattanzio et al., 2013) Il a également été mis en évidence que l'activation des PLC $\gamma$ 1 et des PKC $\gamma$  permettait la translocation des protéines HSP90 $\alpha$  à la membrane plasmique, facilitant alors le processus métastatique dans des lignées cellulaires de cancer du sein. (Yang et al., 2014)

La surexpression de CaMKK2 quant à elle a été observée dans les cancers ovariens séreux de haut grade promouvant alors la croissance et la viabilité cellulaire. (Gocher et al., 2017).

Enfin, la CaMKII $\alpha$  surexprimée dans les ostéosarcomes est également impliquée dans les mêmes phénomènes. (Daft et al., 2013)

A la vue de ces différents exemples, cibler ces molécules effectrices peut alors être une stratégie thérapeutique.

## C. Impact des flux calciques dans les grands processus cellulaires impliqués dans la cancérogenèse

### Le calcium est impliqué dans les différents « hallmarks » du cancer

Des dérégulations des flux calciques peuvent perturber la plupart des processus cellulaires et ainsi promouvoir la cancérogenèse. La modulation d'un même canal peut en effet permettre la mise en place de plusieurs hallmarks différentes du cancer.

#### Canaux SOC et « hallmarks »

Il a été mis en évidence que la surexpression des canaux Orai3 dans les cancers du poumon non à petites cellules induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, en inhibant l'expression des Cdk2 et Cdk4 et les cyclines D1. L'inhibition de ce canal permet donc de mettre en évidence son implication dans l'échappement aux régulateurs du cycle cellulaire. (Ay et al., 2013) Par ailleurs, la surexpression d'Orai3 promeut également la prolifération en induisant c-myc dans les cancers du sein. (Faouzi et al., 2013). Enfin, le courant capacitif induit par STIM1 est également impliqué dans le processus de mise en place de la sénescence des cellules cancéreuses de la prostate, l'échappement à la réponse immunitaire intratumorale dans le mélanome et dans le processus inflammatoire dans le cancer du côlon. (Weidinger et al., 2013) (Wang et al., 2015) (Xu et al., 2015)

#### Canal MCU et «hallmarks»

Dans les cancers du sein, il a été mis en évidence que la surexpression du MCU augmente le stock de calcium disponible pour le fonctionnement des enzymes impliquées dans les processus métaboliques et induit la production d'espèces réactives de l'oxygène dérégulant de ce fait le métabolisme énergétique. (Tosatto et al., 2016)

#### TRP et «hallmarks»

L'implication des canaux TRP est également bien identifiée dans la cancérogenèse, notamment dans les processus d'invasion et d'angiogenèse, puisque l'inhibition des canaux TRPM8 bloque l'invasion dans les cellules de carcinomes squameux oraux et que l'inhibition des TRPC6 inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). (Okamoto et al., 2012) (Ge et al., 2009) Enfin, Shaefer a mis en évidence, dans des cellules de cancer du poumon à petites cellules sévrées, que la stimulation du canal TRPA1 induisait une résistance à l'apoptose. (Schaefer et al., 2013).

#### VOCC et «hallmarks»

Une autre étude réalisée dans les cancers de l'ovaire montre que l'inhibition des canaux calciques voltages dépendants de type T par le Mibefradil sensibilise à la chimiothérapie à base de carboplatine, dans un modèle de carcinose péritonéale murin. (Dziegielewska et al., 2016)

L'implication des canaux calciques a donc été observée dans la plupart des hallmarks du cancer. Le calcium apparaît donc être un acteur majeur de la cancérogenèse. (Figure 84)



Figure 84 : Implication des flux calciques dans la mise en place des «hallmarks» du cancer

Par ailleurs, son implication dans la résistance à l'apoptose, mécanisme également inhibé par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, nous a alors conduits à nous demander si des liens existent entre la signalisation calcique et l'expression de Mcl-1.

#### Le calcium module Mcl-1

Plusieurs exemples démontrent en effet que le calcium est capable de moduler Mcl-1. Ainsi, il a été mis en évidence que la mutation de STIM-1 dans son domaine EF-hand induit une entrée capacitive de calcium constitutive et induit la transcription de Mcl-1, par rapport aux cellules exprimant la forme non mutée de STIM1. (Hewavitharana et al., 2008). Au contraire, les lymphocytes T CD4+ de souris déficientes en Orai1 qui n'ont plus d'entrée capacitive de calcium, prolifèrent davantage et sont plus résistantes à la mort cellulaire que les cellules exprimant Orai1. Cet effet est corrélé à l'induction de Mcl-1. (Kim et al., 2011)

Un autre exemple montre qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium provoquée par la thapsigargine induit l'expression transcriptionnelle de Mcl-1 dans les mélanomes. (Jiang et al., 2008)

Une dernière étude met en évidence que l'inhibition de la CamKII par le KN-93 entraîne une inhibition de l'expression de Mcl-1 et de l'apoptose dans les lignées tumorales prostatiques hormono-réfractaires. (Rokhlin et al., 2010)

Au vu de ces différents exemples, l'inhibition de Mcl-1 par l'intermédiaire de la modulation des flux calciques est donc possible. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la modulation du calcium sur les deux grandes voies principales connues pour réguler Mcl-1 : MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR.

- Focus sur la modulation des voies de prolifération MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR par le calcium

#### Modulation de la voie MAPK/ERK par le calcium :

Plusieurs arguments montrent un lien entre le calcium et la voie MAPK/ERK. En effet, une étude a mis en évidence que le Bisphénol A induit la phosphorylation de ERK *via* l'activation de la CaM dans les cellules de Sertoli. (Qian et al., 2014) Dans un contexte tumoral, il a été mis en évidence qu'inhiber les canaux Orai3 conduisait à l'inhibition de ERK et à l'arrêt des cellules dans le cycle cellulaire en phase G1. (Faouzi et al., 2013) Par ailleurs, l'activation des canaux TRPM7, également fréquemment surexprimés dans les cancers glioblastomes, est capable d'induire p-ERK et la migration et l'invasion cellulaire. (Wong et al., 2017)



### Modulation de la voie PI3K/Akt/mTOR par le calcium :

Dès la fin des années 1990, il a été démontré que le calcium intracellulaire régula l'activité de la P70S6K. (Graves et al., 1997) Depuis, de nombreux arguments montrent que la voie PI3K/Akt/mTOR peut être régulée à différents niveaux par le calcium et que des dérégulations des signaux calciques peuvent entraîner des modifications au niveau de cette voie.

- Modulation de la PI3K par le calcium :

Il a été montré que le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), en se fixant à son récepteur à tyrosine kinase TrkB, active la PI3K et la voie en aval aboutissant à la phosphorylation de P70S6K. Cet effet est entravé par l'inhibition du calcium et de la calmoduline. (Zhou et al., 2010)

- Modulation d'Akt par le calcium :

De très nombreux arguments ont prouvé qu'Akt était la cible du calcium. Ainsi, la CaM activée par le calcium est capable d'interagir directement avec Akt en se fixant à son domaine d'homologie pleckstrin et peut ainsi réguler ses interactions avec le PIP3. (Dong et al., 2007)

Par ailleurs, l'inhibition des VOCC de type T par le Mibéfradil contrecarre l'activation de la voie Akt/mTOR, ce qui bloque la prolifération et induit la mort cellulaire dans des cellules de glioblastomes. Une surexpression de mTOR permet de réduire partiellement l'effet du Mibéfradil. (Zhang et al., 2017). Ce composé, en inhibant l'activation d'Akt, diminue l'expression de la survivine dans les cancers ovariens. (Dziegielewska et al., 2016)

Les canaux SOC sont également fortement impliqués dans l'activation d'Akt. En effet, l'inhibition d'Orai3 inhibe la phosphorylation d'Akt dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire à non petites cellules. (Ay et al., 2013) Par ailleurs, plusieurs études ont montré un lien entre SOC/CamKII et Akt. Ainsi, dans un modèle de cellules cancéreuses colorectales, le SKF-96365 (un inhibiteur de SOC), permet l'inhibition d'Akt *via* la CamKII *in vitro* et *in vivo* sur des tumeurs xénotransplantées. (Jing et al., 2016). Ce lien a également été démontré dans des modèles de lymphocytes B et d'adénocarcinomes gastriques (Ke et al., 2013) (Dai et al., 2015)

Enfin, l'activation d'Akt peut être induite par la CamKII comme c'est le cas dans les cancers ovariens sévères de haut grade. L'inhibition de la CamKII conduit à l'inverse à la déphosphorylation d'Akt en Ser<sup>473</sup> et Thr<sup>308</sup> et à une inhibition de la croissance et de la viabilité cellulaire. (Gocher et al., 2017)

Il est intéressant de noter que la voie PI3K/ Akt est également capable de réguler l'entrée de calcium dans la cellule. En effet, l'EGF en se fixant à son récepteur active Akt. Celle-ci phosphoryle en retour STIM1 ce qui entraîne la translocation d'Orai1 et de TRPC1 au niveau des radeaux lipidiques contenant le canal SK3 (small conductance calcium-activated potassium channel 3). Ce complexe facilite l'entrée capacitive de calcium et augmente la phosphorylation d'Akt. Celle-ci peut à son tour activer la protéine Rac-1 et active de nouveau l'entrée capacitive de calcium. (Guéguinou et al., 2016) De même, Schimdt et al. ont montré une augmentation de l'expression de STIM1, Orai1, p-Akt et de l'entrée de calcium capacitive dans des cellules cancéreuses ovariennes rendues résistantes au cisplatine (A2780cis), par rapport à leurs homologues (A2780) sensibles au platine. Ils ont montré par la suite que l'augmentation de la phosphorylation d'Akt dans des cellules sensibles permet d'augmenter l'activité de ces canaux et pourrait alors participer à l'induction de la chimiorésistance. D'ailleurs l'inhibition d'Akt, comme celle d'Orai1 restaure la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. (Schmidt et al., 2014)

- Modulation de mTOR par le calcium :

Les premiers travaux ont mis en évidence que la chélation de calcium extracellulaire par l'EGTA (ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) était capable de réverser l'action de l'EGF et ainsi de déphosphoryler P70S6K sans moduler l'activité d'Akt. (Conus et al., 1998) Cette étude a été confortée par celle de Mercan qui a prouvé que l'entrée d'acides aminés dans la cellule était capable d'induire mTORC1 de manière calcium-dépendante sans requérir l'activation d'Akt dans des myoblastes murins. (Mercan et al., 2013) En outre, une autre étude menée sur les cellules Hela et HEK 293 montre que les acides aminés activent mTORC1 *via* la formation du complexe  $Ca^{2+}$ /Calmoduline/hVps34 (Gulati et al., 2008). (Figure 85)

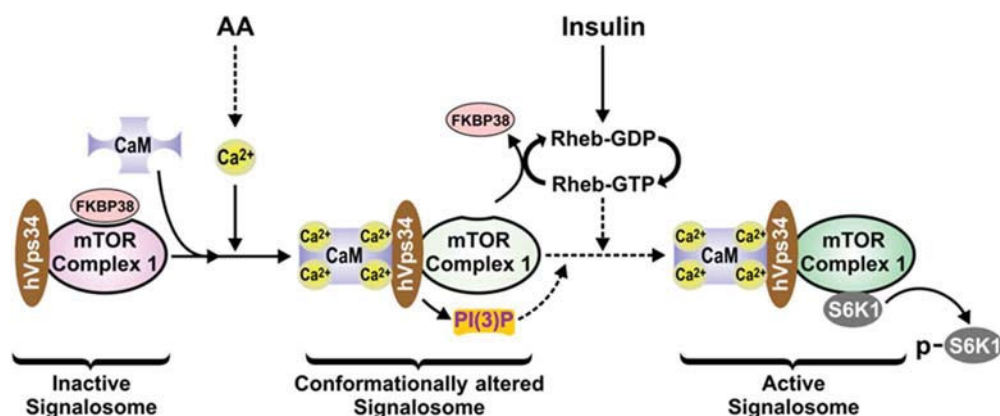


Figure 85 : Modèle d'activation de mTORC1 par les acides aminés faisant intervenir la CaM et hVps34. (Gulati et al., 2008)

Li *et al.* ont également montré que le calcium libéré des lysosomes par les canaux TRPML1 permettait l'induction de la voie mTORC1 par l'intermédiaire de la CaM. Cependant, dans leur étude, ils réfutent les résultats de Gulati puisqu'ils n'identifient pas hVps34 comme intermédiaire et mettent en évidence que la CaM se lie directement à mTOR. (Gulati et al., 2008) (Li et al., 2016)

L'ensemble de ces arguments montre que la voie PI3K/Akt/mTOR peut être contrôlée par le calcium à différents niveaux. De nombreux composés du calcium toolkit peuvent alors être la cible de molécules pharmacologiques. Celles-ci, en modulant le signal calcique pourraient moduler l'activation de la voie AKT/mTOR et de ce fait contrôler l'expression de Mcl-1. (Figure 86).

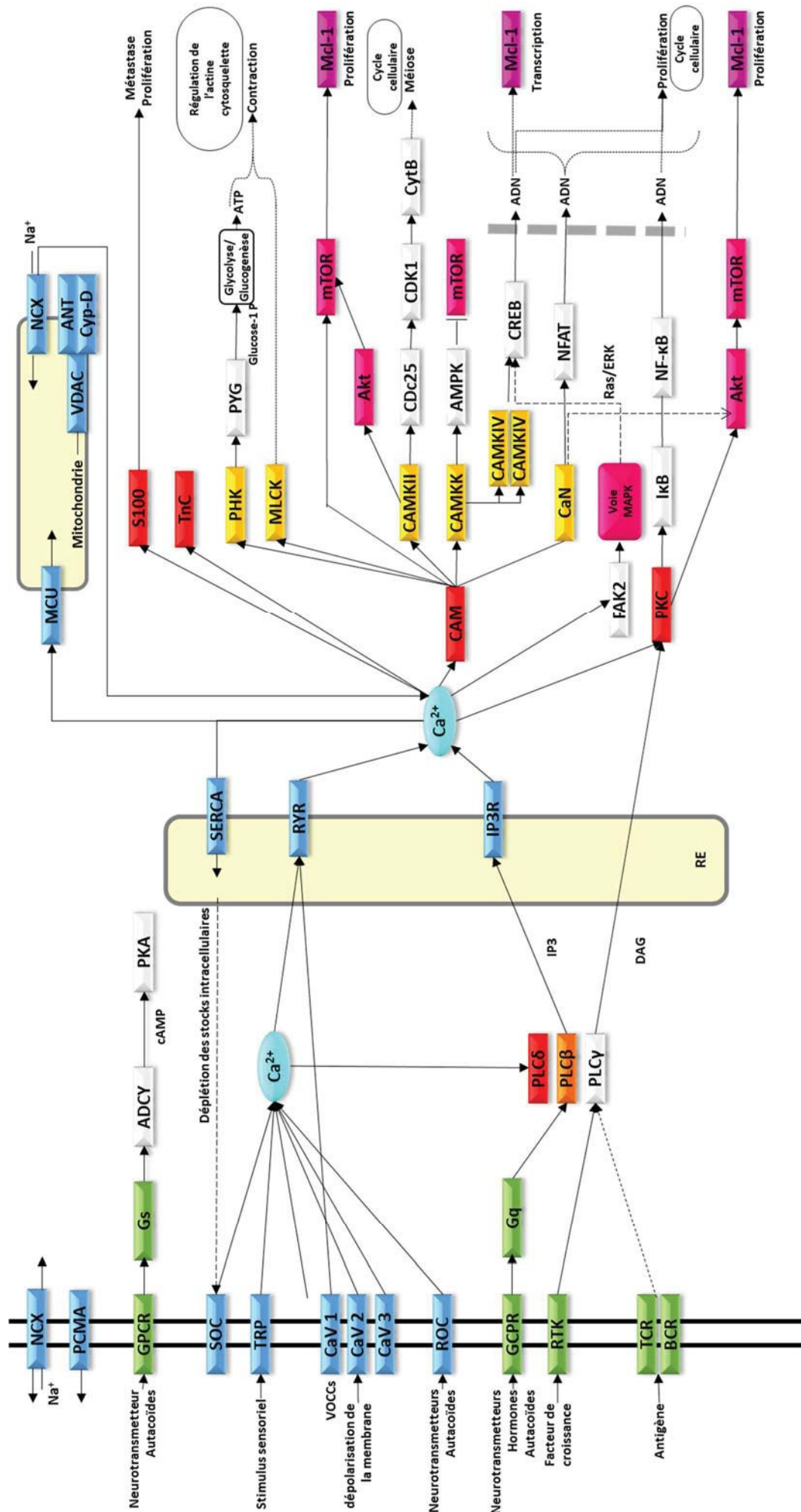
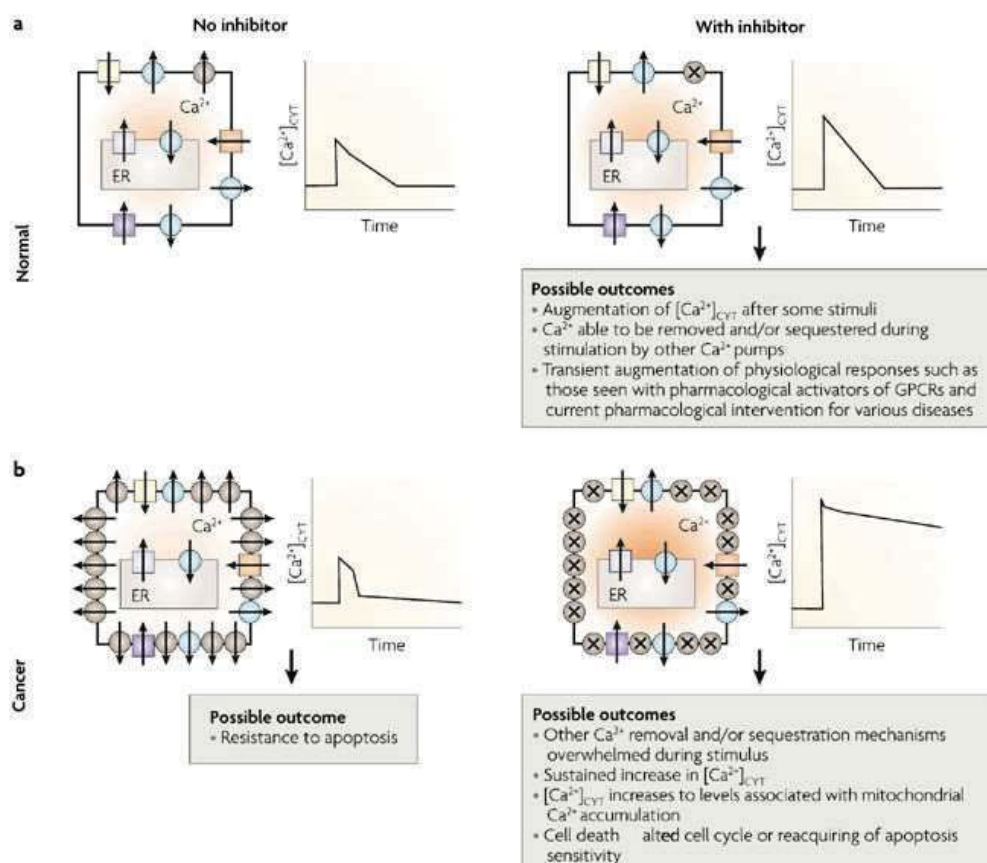


Figure 86 : Implication du calcium dans la modulation des voies de signalisation.

## 7. Cibler le calcium, une stratégie pertinente ?

Même si le calcium est impliqué dans la plupart des processus cellulaires, la grande spécificité du signal calcique va permettre la mise en place d'une réponse particulière au sein de la cellule. Par ailleurs, de nombreux exemples mettent en évidence l'implication des dérégulations des flux calciques dans la cancérogénèse et la chimiorésistance *via* notamment une modulation d'expression ou d'activité des canaux calciques. Ainsi, une surexpression d'une pompe calcique provoquant un efflux de calcium excessif hors de la cellule cancéreuse peut provoquer la résistance à l'apoptose. L'utilisation d'un inhibiteur dirigé contre cette pompe calcique dérégulée produit alors une perturbation majeure de l'homéostasie calcique dans la cellule cancéreuse, entraînant des altérations dans le cycle cellulaire et/ou la mort cellulaire. De plus, cette inhibition aurait un effet plus prononcé dans la cellule cancéreuse que dans les cellules saines, même si cette pompe est aussi exprimée dans les cellules non-cancéreuses. (Monteith et al., 2007) (Figure 87)



**Figure 87 : Cibler spécifiquement une pompe calcique exprimée de façon aberrante. (Monteith et al., 2007)**  
 Représentation schématique de la façon dont il est possible de cibler une pompe calcique spécifique surexprimée (brune) dans une cellule cancéreuse. a. une cellule normale sans inhibiteur de la pompe calcique spécifique (gauche) ou avec l'inhibiteur (x) de la pompe calcique spécifique (droite). b. une cellule cancéreuse sans l'inhibiteur spécifique de la pompe calcique (gauche). Une cellule traitée avec l'inhibiteur spécifique de la pompe calcique (droite).  
 $[Ca^{2+}]_{cyt}$  : concentration d'ions calcium libres cytosoliques ; GPCRs : Récepteurs couplés à une protéine G.

Dans ce cadre, de nombreux composés ont été mis en évidence ou synthétisés pour étudier la modulation de ces canaux ou effecteurs et *in fine* inhiber le processus de cancérogénèse. (Tableau 8)

Tableau 8 : Synthèse de composés ciblant les canaux calciques/transporteurs/pompes. (Cui et al., 2017)

Channel/Transporter	Compound	Mechanism	Cancer	
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	SERCA	Cyclopiiazonic acid, thapsigargin, G202, KP1019 Saikosaponin-d, Alisol B	Inhibitor	Prostate, hepatoma, colon, cervical, breast cancer and nasopharyngeal
	SERCA2	RL71	Inhibitor	Colon cancer
	PMCA	[Pt(O,O'-acac)(γ-acac)](DMS)]	Inhibitor	Breast cancer
VGCC	T-type	KYS05047, mibefradil, NNC-55-0396, amlodipine	Blocker	Hepatoma, lung pancreatic cancer, epidermoid carcinoma and glioma
	T-type	Ghrelin	Increase protein expression	Prostate cancer
TRP	TRPA1	HC-030031	Inhibitor	–
		Polygodial and analog	Activator	Glioma, melanoma, uterine, lung and breast cancer
	TRPC	20-GPPD	Activator	Colon cancer
	TRPC	SKF96365, M804	Blocker	Glioma
	TRPC1	EVP4593	Inhibitor	Neuroblastoma
	TRPC4/5	(-)-Englerin A	Activator	Renal and colon cancer
	TRPC4/5	M804 analog, ML204	Inhibitor	–
	TRPC3/6	GSK2332255B, GSK2833503A	Inhibitor	–
	TRPC6	GaQ <sub>3</sub>	Induce protein expression	Breast, lung, osteosarcoma and hepatoma
	TRPV	CPZ	Inhibitor	OSCC
	TRPV1	CBD, Capsaicin	Agonist	Colon cancer, renal carcinoma.
	TRPV2	2-APB, cannabinoid, lysophospholipid and probenecid	Agonist	Glioblastoma, bladder cancer
		Ruthenium red, TEA, TRIM, 4-aminopyridine, SKF96365 and tranilast	Antagonist	Breast cancer
	TRPV4	GSK1016790A	Agonist	Prostate cancer
		GSK2193874, RN-9893, BTP2	Inhibitor	–
	TRPM8	CBG, M8-B	Inhibitor	Lymphoma, lung, breast, prostate and skin pancreatic,
		D-3263	Agonist	Various advanced cancer
TRPML	ML-SA1	Agonist	–	
TRPML1	MK6-83	Agonist	–	
TRPV6	TH-1177, Soricidin, SOR-C13 and SOR-C27	Inhibitor	Ovarian, prostate and brain cancer	
Orai	CRAC	Carboxyamidotriazole, dihydropyridine, MRS-1844, MRS-1845, BTP2	Inhibitor	Hepatoma, lung, bladder, kidney, NSCLC, glioma and leukemia
	STIM1	ML-9	Translocation inhibitor	Prostate Cancer
	Orai1-STIM1	SKF96365	Inhibitor	Esophageal, breast and colon cancer
	Orai1	La <sup>3+</sup> , Gd <sup>3+</sup> , AnCoA4, SB01990, SPB06836, KM06293, RH01882, GSK-5503A, GSK-7975A, mAbs	Inhibitor	Lung cancer and glioma
	–	2-APB and its analogues, DPB-162AE and DPB-163AE	Inhibitor/Activator	Colon cancer and glioma
Purinergic receptor	–	RO2959	Inhibitor	–
	–	Suramin	Inhibitor	Prostate cancer
	P2X7	AZ10606120, A-740003, A-438079, brilliant blue G, oxidized ATP	Inhibitor	Colon cancer and renal melanoma
	P2X2/3	A-317491, AF-353	Inhibitor	–
RyR	–	4-Chloro- <i>m</i> -cresol, caffeine and its analogs	Agonist	Breast and prostate
NCX	–	ORM-10103, KB-R7943, OSW-1, DMS, bepridil and benzothiazepine analogues, such as diltiazem, clonazepam and CGP-37157	Blocker	Leukemia, colon and brain cancer
		SKF96365	Enhancer	Glioma
		Ghrelin	Increase protein expression	Prostate cancer
IP <sub>3</sub> R	–	Xestospongin B, xestospongin C	Inhibitor	Neuroblastoma, prostate and breast cancer
	IP <sub>2</sub> R1	2-APB	Inhibitor	Gastric cancer
	IP <sub>3</sub> R3	Heparin, caffeine	Inhibitor	Colon cancer and glioma
–Not Known				

Le SKF-96365 est en effet capable d'inhiber l'entrée de calcium capacitive et certains TPRC. Il a montré sa capacité à sensibiliser les cellules radiorésistantes de glioblastomes, surexprimant TRPV6. (Ding et al., 2010)

La xestospongine c, et le 2-APB, inhibiteurs des IP3R, sont également capables d'inhiber la croissance tumorale dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 stimulée par du sérum de veau fœtal ou de la 17- $\beta$ œstradiol. (Szatkowski et al., 2010)

Cependant, la plupart de ces molécules ne sont pas utilisables en clinique, et bien que la modulation des flux calciques ait déjà montré ses bénéfices dans le traitement des cancers *in vitro* et *in vivo*, peu de modulateurs calciques aujourd'hui sont disponibles pour le traitement de ces pathologies. (Tableau 9)

Tableau 9 : Composés modulateurs des flux calciques ayant fait l'objet d'essais cliniques (Prevarskaya et al., 2013 ; Cui et al., 2017 ; Tian et al., 2012 ; Lu et al., 2012 recherche effectuée sur <https://clinicaltrials.gov> en octobre 2017)

Molécule	Cible	Evaluation	Types de tumeurs
G-202 (Mispagargine)	Inhibiteur des pompes SERCA	Phase I /II	Tumeurs avancées Cancer de la prostate Glioblastome Hépatocarcinome Cancer rénal
artésunate (Artémisinine)	Inhibiteur des pompes SERCA	Phase I/II	Cancer du sein Cancer anal Cancers colorectal/intestin
Digoxine	Inhibiteur de la pompe Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -ATPase	Phase I/II	Cancer de la prostate Cancer du sein Cancer de la tête et du cou Cancer du poumon non à petites cellules Cancers solides Sarcome de Kaposi Mélanome Leucémie myéloïde aigue/syndrome myélodysplasique
Digitoxine (CP4071)	Inhibiteur de la pompe Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -ATPase	Phase II	Sarcome
Diindolylméthane	Inducteur du relargage du calcium du RE et des SOC	Phase I/II /III	Cancer de la prostate Cancer du sein  Dysplasie cervicale
Vismodegib	Augmente la concentration de calcium cytoplasmique et diminue la concentration de calcium dans le RE	Phase I/II	Cancer de la prostate Cancer du sein Cancer du pancréas Cancer colorectal Cancer de l'ovaire Cancers cutanés Cancer de l'estomac Cancer de la jonction gastro-œsophagienne Chondrosarcome Cancer du poumon Sarcomes Myélome Médulloblastome Gliome Méningiome Lymphomes Leucémie lymphoïde chronique Leucémies myéloïde aigue Cancers avancés
Carboxyamidotriazole	Inhibiteur des canaux capacitifs voltage et non voltage-dépendants	Phase I/II/III	Cancer du rein Gliomes Cancer du poumon Cancer de la trompe de Fallope Cancer de l'ovaire Cancer du péritoine primitif lymphomes Tumeurs solides avancées
Caféine	Inhibiteur des IP3R	Phase I/II	Cancer de la prostate Tumeurs solides Cancers du sein Tumeurs neuroendocrines Cancer colorectal
Mibefradil	Inhibiteur des VOC de type T	Phase I	gliomes
SOR-C13	Inhibiteur TRPV6	Phase I	Tumeurs solides avancées surexprimant TRPV6
D-3263	Activateur TRPM-8	Phase I	tumeurs solides avancées



Parmi la dizaine d'inhibiteurs des flux calciques ayant fait l'objet d'essais cliniques dans le traitement des cancers, deux ont été référencés dans les cancers de l'ovaire : le Vismodegib et le carboxyamidotriazole (CAI).

Les études de phase II concernant les effets du Vismodegib comme inhibiteur de la voie Hedgehog dans les cancers de l'ovaire seul après une deuxième ou troisième rémission complète (NCT00739661), ou en combinaison avec le Bévacizumab (NCT00959647), ne permettent pas de conclure sur les effets bénéfiques à utiliser cette molécule dans ces cancers. (Kaye et al., 2012)

Le CAI et son dérivé le carboxyamidotriazole orotate ont passé des essais cliniques de phases I et II en tant qu'agent tumorostatique et anti-angiogénique administrable *per os*. Ce composé fait partie des deux seules molécules modulatrices des flux calciques (avec le Diindolylméthane) à avoir fait l'objet d'un essai clinique de phase III. Ses principales caractéristiques sont développées ci-après.

## 8. Le carboxyamidotriazole (CAI)

Le carboxyamidotriazole (ou L-651,582) et ses différents dérivés ont été synthétisés dans le but de trouver de nouvelles molécules capables de traiter les coccidioses, maladies parasitaires dues à des protozoaires du genre *Eimeria* faisant des ravages dans l'industrie de la volaille (Kohl et al., 1988). Ce composé est un dérivé de la bredinine, un produit naturel anti-viral connu pour inhiber l'inosine monophosphate déshydrogénase enzyme jouant un rôle pivot chez ces protozoaires. Comme le montre la structure chimique développée, le CAI est un composé 1,2,3 triazolé monocyclique. Cette structure confère au CAI et aux triazolés en général, une bonne solubilité et une capacité accrue à se lier à des cibles biologiques. Les composés de cette famille sont très fréquemment retrouvés en médecine humaine et animale pour leurs propriétés anti-virale (HIV), anti-tumorale, anti-bactérienne. Cette structure lui confère une stabilité chimique vis-à-vis de l'hydrolyse, des conditions d'oxydo-réduction et des dégradations enzymatiques (Dheer et al., 2017). Le CAI comporte une fonction benzophénone en N1, une fonction carboxamide en C4 et un groupement amine en C5 du groupement triazole (Bochis et al., 1991). Un dérivé sous forme de sel utilisable par voie orale, CTO (Carboxyamidotriazole orotate) a également été développé et a montré une toxicité réduite, une biodisponibilité orale et une efficacité accrues par rapport au composé parental. Plusieurs formulations galéniques ont été mises au point et utilisées lors des différents essais cliniques: une forme micronisée (en poudre), sous forme de capsule molle ou sous forme liquide (Berlin et al., 2002) (Figg et al., 1995). (Figure 88)

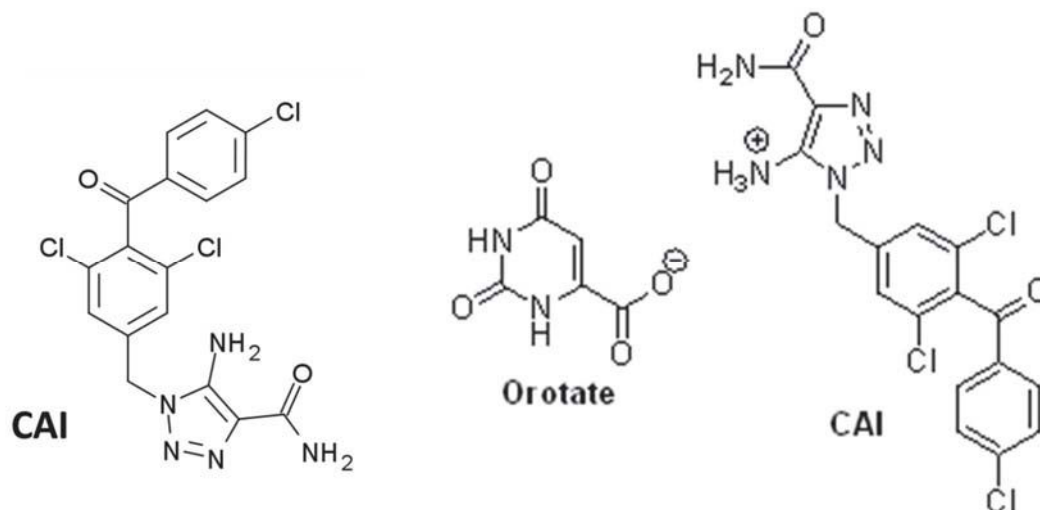


Figure 88 : Structure chimique du CAI et du CTO.

### Actions sur l'inhibition du calcium

Les études d'activité de ce composé ont rapidement montré que son action ne passait pas par l'inhibition de l'inosine monophosphate déshydrogénase mais par l'inhibition de l'entrée de calcium dans la cellule hôte (Hupe et al., 1991). Ainsi, grâce à des techniques de patch-clamp, il a été mis en évidence que l'inhibition des flux calciques induite par le CAI pouvait être attribuée à sa capacité à inhiber les canaux calciques voltage dépendant de type T ou L dans des cellules atriales de cochon d'Inde.

Cependant, la plupart des résultats obtenus sur le CAI révèle que ce composé inhibe des canaux calciques non-voltage dépendant. Dans ce contexte, deux études ont mis en évidence que le CAI bloque le flux de calcium activé par la liaison de l'agoniste muscarinique, le carbachol, sur son récepteur (RCPGq) dans des lignées de CHO. (Felder et al., 1991) (Gusovsky et al., 1993)

En outre, le CAI bloque la formation d'IP3 dans les HUVEC mais également dans les cellules Rat-1 (Faehling et al., 2002) (Rodland et al., 1997). Ceci suggère que cet inhibiteur bloque la sortie de calcium *via* les IP3R, effet démontré dans les lignées de carcinomes rénaux (Dragoni et al., 2014).

Par ailleurs, le CAI est capable d'inhiber les flux de calcium induits par l'acide arachidonique dans des modèles de cellules épithéliales dérivant de carcinomes mammaires (Fiorio Pla et al., 2008) (Fiorio Pla et al., 2010).

Enfin, plusieurs études ont prouvé que le CAI a une action sur les SOC dans différents modèles. Ainsi, le CAI inhibe ces canaux dans des modèles de cellules progénitrices endothéliales (Lodola et al., 2012), les lignées cellulaires d'hépatomes (Enfissi et al., 2004) et les lignées de carcinomes rénaux (Dragoni et al., 2014). Néanmoins, Mignen a montré que le CAI n'inhibe pas directement les SOCE dans les HEK293. En effet, cette équipe suggère que l'inhibition de ces canaux serait corrélée à la capacité de ce composé à dépolariser la membrane interne mitochondriale. Cette perte de potentiel

membranaire jouant le rôle de force motrice pour le Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU), cela bloquerait l'entrée de calcium dans la mitochondrie et inhiberait de ce fait l'entrée capacitative de calcium par les SOC (Mignen et al., 2005).

D'autres études montrent également que le CAI agit sur la mitochondrie et provoque une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette action sur la respiration mitochondriale s'accompagne d'une activation de la glycolyse anaérobie, phénomène vérifié par l'augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate qui conduit à une acidification du milieu de culture (Ju et al., 2016).

### Actions anti-cancéreuses

#### *Action anti-proliférative et anti-invasive*

Les premières études menées sur le CAI ont montré qu'il inhibe la prolifération de nombreuses lignées tumorales aussi bien non humaines (Fibroblastes de rat, mélanomes de souris B16F10) qu'humaines (A2758 mélanome, MCF-7 sein, PC3 prostate, OVCAR3 ovaire), ainsi que le développement de tumeurs ovariennes (OVCAR3) xénotransplantées chez la souris (Kohn et al., 1992). Cet effet a également été observé dans d'autres modèles cellulaires tels les cellules cancéreuses du poumon (Moody et al., 2003), de la vessie (Perabo et al., 2004), les glioblastomes (Jacobs et al., 1997), dans les cellules de cancers du sein (Lambert et al., 1997) et les cancers de la prostate (Wasilenko et al., 1996) et s'accompagne d'une inhibition de phénomènes d'invasion tumorale.

De façon intéressante, il a été montré que le CAI possède une action anti-proliférative sélective sur les lignées tumorales comparées aux lignées immortalisées dans des modèles de cancer de la tête et du cou (Wu et al., 1997). De plus, cette étude met en évidence que le CAI est également capable d'inhiber l'expression des métalloprotéinases 2 et 9 (enzymes dégradant la matrice extracellulaire promouvant ainsi l'invasion des cellules tumorales). Cet effet sur la MMP-2 a également été retrouvé dans des lignées de mélanomes, de cancer ovarien, de fibrosarcome, de cellules endothéliales et de cellules endothéliales pigmentaires rétinienne (Kohn et al., 1996) (Kohn et al., 1994) (Hoffmann et al., 2005).

L'inhibition des SOC par le CAI bloque la prolifération des cellules d'hépatome humain (Enfissi et al., 2004) ainsi que celles des HEK293 renforçant l'implication de ces canaux dans les processus de cancérogenèse. (Mignen et al., 2005)

Par ailleurs, le traitement par le CTO de cellules de leucémie myéloïde chronique résistante à l'imatinib ralentit la prolifération de ces lignées cellulaires *in vitro*. Cet effet s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation de la kinase oncogène Bcr-Abl et des voies de survie en aval (Ras/ERK, STAT5, Akt) (Alessandro et al., 2008) (Corrado et al., 2011).

### *Action anti-angiogénique*

Le CAI a démontré son potentiel anti-angiogénique dans de nombreux modèles cellulaires. Ainsi, ce composé bloque le signal calcique induit par la fixation du VEGF sur son récepteur VEGFR2 expliquant le rôle anti-angiogénique de ce composé dans les cellules HUVEC (Faehling et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que le CAI inhibe l'expression de la NO synthase (connue pour être régulée par le calcium et induire la transcription du VEGF) et inhibe l'expression et la sécrétion du VEGF. Néanmoins dans cette étude, l'implication directe de l'effet du calcium sur la NO synthase n'a pas été recherchée (Bauer et al., 2000)

Son action anti-angiogénique a également été observée dans un modèle de néovascularisation oculaire induite par l'hyperoxie chez la souris. Cependant, bien que les auteurs suggèrent fortement une inhibition du VEGF, le mécanisme moléculaire mis en jeu n'a pas été décrypté. Par ailleurs, le CAI confère une neuroprotection rétinienne après une lésion ischémique. Ces effets s'expliquent en partie par une induction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Franklin et al., 2004).

Son effet sur l'angiogénèse a également été montré sur des cellules endothéliales dérivées de carcinomes de sein humain (B-TEC). Dans ce modèle, le CAI inhibe les flux de calcium induits par l'acide arachidonique ce qui réduit la tubulogénèse de ces cellules (Fiorio Pla et al., 2008).

Enfin, cet inhibiteur calcique inhibe la sécrétion du VEGF des cellules de mélanome A2058 *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de souris. De manière intéressante, ce composé inhibe également la sécrétion de VEGF et d'IL-8 (cytokine pro-angiogénique) dans le plasma des souris. Par ailleurs, des expériences de migration utilisant des chambres de Boyden montrent que le CAI réduit la migration des cellules HUVEC induite par le VEGF. (Oliver et al., 2003)

### *Action anti-inflammatoire*

Une autre propriété du CAI décrite plus récemment est sa capacité à inhiber les processus inflammatoires dans différents modèles. Dans ce contexte, il a été démontré que ce composé inhibe l'œdème induit par une application d'huile de croton sur l'oreille de rats et la sécrétion d'IL-1. Par la suite, la même équipe a mis en évidence que le CAI entrave la sécrétion de TNF alpha dans la lignée de macrophages RAW264.7. De façon tout à fait intéressante, cette inhibition bloque l'invasion des cellules de carcinome de poumon lorsque celles-ci sont mises en co-culture avec les macrophages. Cet effet est accentué lorsque le CAI est co-administré avec la dexaméthasone (corticoïde immunosuppresseur) *in vitro* et *in vivo*. Cette propriété anti-inflammatoire joue donc de façon indirecte sur la prolifération (Guo et al., 2008).

## *Mort cellulaire par apoptose*

### *Effet en agent seul*

Le CAI possède une action anti-tumorale dans de nombreux modèles cellulaires incluant des cellules tumorales de gliome (Ge et al., 2000), des cancers de l'ovaire chimiorésistants (Kohn and Liotta, 1990), des cancers de vessie de rat *in vivo* (Fiorio Pla et al., 2010) (Perabo et al., 2005) ou des cellules humaines de cancer de la vessie (Perabo et al., 2004). En ce qui concerne cette dernière étude, la mort est corrélée à une inhibition de Bcl-2 sans qu'un lien de cause à effet ait été démontré.

Le CAI inhibe par ailleurs, la prolifération des cellules MCF-7 et entraîne l'accumulation de cellules en phase G2 / M et l'induction de l'apoptose. Ces résultats sont comme précédemment corrélés à une inhibition de l'expression de Bcl-2 mais également à une perte du potentiel de membrane mitochondriale. (Guo et al., 2006)

Enfin, le CAI induit la mort par apoptose des lignées de leucémies myéloïdes chroniques résistantes à l'imatinib *via* l'induction de ROS. (Alessandro et al., 2008).

### *Effet en combinaison*

Plusieurs études ont mis en évidence que le CAI potentialise l'effet anti-tumoral de certaines molécules *in vitro*. L'avantage de la nature synergique d'une combinaison de molécules est que cette association produit une efficacité thérapeutique accrue à des doses plus faibles que celles qui pourraient être utilisées par l'un ou l'autre des composés utilisés en agent seul, réduisant de ce fait les effets toxiques.

Ainsi, combiné au LM-1685, un inhibiteur de la cyclooxygénase-2, le CAI induit la mort des cellules de cancer colorectal (Winters et al., 2005). De plus, dans un modèle de cellules cancéreuses du poumon, le CAI agit de façon synergique avec le 2-déoxy-D-glucose, le premier bloquant la chaîne respiratoire mitochondriale et le second inhibant la glycolyse. Il en résulte une diminution drastique de la production d'ATP et un effet anti-tumoral accru *in vitro* et *in vivo* (Ju et al., 2016). Enfin, le CAI potentialise l'effet anti-tumoral du sorafenib dans les lignées de cancer du poumon. Ainsi, la combinaison de ces 2 composés inhibe *in vitro* et *in vivo* l'expression du facteur de transcription NANOG connu pour jouer un rôle pivot dans la tumorigénèse, les métastases et la chimiorésistance des cellules souches cancéreuses (Chen et al., 2017).

## Essais cliniques

### Essais de phase I

Les premières études de pharmacocinétique réalisées lors d'essais cliniques de phase I ont montré que le CAI est un composé capable d'être absorbé par voie orale (avec une meilleure absorption sous forme de gélule que sous forme liquide). Par ailleurs, la dose efficace (identifiée dans des expériences *in vitro*) pouvait être atteinte chez le patient par l'utilisation d'une prise quotidienne sans apparition d'effet indésirable notable. Ce composé est métabolisé dans le foie par le CYP3A4 suggérant que des inhibiteurs de cette enzyme peuvent augmenter la concentration plasmatique du CAI (Figg et al., 1995). Dans cette optique, un essai clinique évaluant l'effet du kétoconazole (composé azolé inhibiteur du Cyp 3A4 inhibiteur) sur les paramètres pharmacocinétiques du CAI a permis de mettre en lumière que le kétoconazole augmente de façon importante la concentration plasmatique du CAI, l'aire sous la courbe et diminue la clairance de ce composé. En outre, aucun effet secondaire important n'a été observé (Desai et al., 2004).

Des études de toxicité ont par la suite montré que la dose maximale utilisable chez les patients est de 300 mg/m<sup>2</sup>. A cette dose, des effets secondaires de type neurotoxique (perte réversible de la vision) apparaissent et limitent l'utilisation de ce composé (Berlin et al., 2002).

La toxicité et l'efficacité de ce composé sur des patients souffrant de cancers solides ont également été évaluées. Administré *per os* sous forme liquide ou de capsule molle, cet inhibiteur n'a pas engendré de toxicité majeure et a permis de stabiliser l'évolution de ces cancers solides dans 49% des cas. (Kohn et al., 1996)

Le CAI a également été utilisé en combinaison avec le paclitaxel dans des cancers solides de localisations différentes. Des combinaisons de 5 doses de chacun des composés ont été testées. Dans cet essai, le CAI a été administré quotidiennement par voie orale et le paclitaxel a été injecté 3 fois par semaine chez les patientes. Cette association a permis d'obtenir une réponse partielle chez 24% des patientes souffrant d'un cancer de l'ovaire en rechute. Les résultats ont par ailleurs montré que cette association était assez bien tolérée et induisait le plus fréquemment des neutropénies (principalement obtenues avec les fortes doses de paclitaxel). En ce qui concerne les effets secondaires non hématologiques, cette association induisait essentiellement des neuropathies, fatigue, nausées et vomissements (Azad et al., 2009). Cette étude vient à l'appui d'un autre essai clinique combinant le CAI à différentes doses au paclitaxel et montrant que les effets secondaires sont peu marqués et que le CAI peut être administré avec d'autres agents anti-néoplasiques. Cependant seule une réponse partielle ou une stabilisation de certains cancers ont été observées (Kohn et al., 2001).

## Essais de phase II

Plusieurs études de phase II ont été conduites avec le CAI dans différents types de cancers. Ainsi, ce composé n'a pas engendré de régression tumorale chez des patients atteints de cancer de la prostate androgéno-indépendant (Bauer et al., 1999). Cependant cette étude a tout de même permis de montrer que le CAI réduisait de 27% le taux de VEGF sérique chez ces patients, prouvant son caractère anti-angiogénique chez l'homme.

Le CAI n'a eu que peu d'effet sur l'évolution des cancers rénaux avancés résistants à l'immunothérapie ou dans les glioblastomes en association avec de la radiothérapie (Dutcher et al., 2005) (Mikkelsen et al., 2007).

Enfin une étude de phase II a mis en évidence que le CAI induit une stabilisation de plus de 6 mois dans les cancers de l'ovaire récurrents et métastatiques démontrant son intérêt dans le traitement de ces cancers (Hussain et al., 2003).

## Essais de phase III

Ce composé a également passé un essai clinique de phase III multicentrique. Dans cet essai, le CAI n'a pas montré de bénéfice comparé à un placebo sur la survie globale lorsqu'il était administré en maintenance dans les cancers du poumon à non petite cellule suite à un protocole de chimiothérapie (Johnson et al., 2008). Une étude rétrospective de cet essai visait également à déterminer les éventuels effets secondaires du CAI comparé à un placebo ; cependant aucune différence n'a été observée (Hillman et al., 2010).

En résumé, le Carboxyamidotriazole est un inhibiteur des canaux calciques qui a montré sa capacité à induire des effets anti-cancéreux. Il est cependant notable que suivant les études et les modèles, son action diffère, ce qui nécessite de tester son action sur les modèles expérimentaux. En ce qui concerne les effets cancéreux, l'ensemble de ces études montrent qu'il exerce principalement une inhibition de la prolifération cellulaire. Il faut souligner qu'un grand nombre d'études restent descriptives et n'expliquent pas le mécanisme moléculaire impliqué. Ainsi, sa combinaison avec des molécules utilisées en chimiothérapie ou ciblant une voie ou une protéine dérégulée dans les cancers s'avèrerait particulièrement intéressante (Kohn and Liotta, 1995) . Les essais cliniques ont mis en évidence que le CAI possède des effets indésirables maîtrisables. Cependant, il ne semble avoir d'efficacité que pour le traitement des cancers ovariens chimiorésistants.(Tableau 10)

Tableau 10 : Essais cliniques du carboxyamidotriazole et du carboxyamidotriazole orotate (CTO) (<https://clinicaltrials.gov> en octobre 2017)

Forme	Référence de l'essais	Phase de l'étude	Stade de l'étude	Type de cancer	combinaison
CTO	NCT01954030	Phase I	Terminée	Gliome malin	Bevacizumab
CTO	NCT01989052	Phase I	Terminée	Gliome malin	Lomustine
	NCT00003249	Phase I	complétée	Tumeurs solides	Ketoconazole
carboxyamidotriazole	NCT00019019	Phase I	complétée	Tumeurs du cerveaux et du système nerveux Cancer du sein Mélanome cancer de l'ovaire Cancer d rien Cancer du poumon Lymphome Cancer du petit intestin Tumeurs solides	Paclitaxel
CTO	NCT01107522	Phase I	En cours	Tumeurs solides Glioblastome, gliome malin récurrent	Temozolomide +/- radiothérapie
carboxyamidotriazole	NCT00005045	Phase II	complétée	Cancer du rein	-
carboxyamidotriazole	NCT00006486	Phase II	complétée	Cancer du rein	-
carboxyamidotriazole	NCT00019461	Phase II	complétée	Cancer de la rompe de Fallope Cancer de l'ovaire Cancer du péritoine primitif	-
carboxyamidotriazole	NCT00004146	Phase II	complétée	Glioblastome à cellules géantes Glioblastome Gliosarcome	Radiothérapie
carboxyamidotriazole	NCT00003869	Phase III	complétée	Cancer du poumon non à petites cellules	-

Le carboxyamidotriazole cumule ainsi des atouts qui ont suscité notre intérêt : il peut moduler des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la régulation de Mcl-1 (ERK et AKT), il est administrable *per os* et il est bien toléré par les patients.

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction, il est connu que : I) les flux calciques sont dérégulés dans les cancers de l'ovaire, II) le calcium module des voies de signalisation suractivées dans ces cancers et qui sont responsables de la régulation de Mcl-1, III) il existe déjà différents arguments qui démontrent une inhibition possible de Mcl-1 par le calcium, IV) l'inhibition concomitante de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 induit l'apoptose dans des lignées cellulaires ovariennes chimiorésistantes ; inhiber Mcl-1 *via* l'inhibition des flux calciques et restaurer l'apoptose en combinaison avec un inhibiteur de Bcl-x<sub>L</sub> semble alors être une stratégie pertinente pour traiter les



cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes. Nous avons donc voulu dans un premier temps prouver ce concept en utilisant un chélateur calcique intracellulaire : le BAPTA-AM. Nous nous sommes ensuite intéressés aux molécules inhibitrices des canaux calciques en essais cliniques et nous nous sommes tournés vers le carboxyamidotriazole (CAI), molécule ayant fait l'objet de différents essais cliniques en particulier dans le cancer de l'ovaire.

# Contexte et objectifs de la thèse

---

Les cancers de l'ovaire sont les cancers gynécologiques les plus meurtriers, avec un taux de survie à 5 ans de 43% tous stades confondus. Ce sombre pronostic s'explique par un diagnostic tardif, lié à l'absence de symptômes caractéristiques. La carcinose péritonéale est alors souvent déjà disséminée et complique donc l'intervention chirurgicale, qui reste à ce jour l'élément majeur de la prise en charge thérapeutique. Une chimiothérapie combinant le Carboplatine, le Paclitaxel et éventuellement du Bévécizumab est également administrée mais malgré une bonne réponse initiale, une rechute apparaît dans la majorité des cas et est associée à une chimiorésistance, conduisant au décès des patientes.

Dans ce cadre, notre équipe s'attache à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et à mettre en évidence des marqueurs pronostiques de la réponse au traitement. La chimiorésistance peut s'expliquer par la capacité des cellules cancéreuses à résister à la mort cellulaire par apoptose. Dans ce contexte, notre équipe a mis en évidence une dérégulation de la balance pro-/anti-apoptotiques en faveur des anti-apoptotiques et en particulier la surexpression de deux anti-apoptotiques : Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 qui coopèrent pour inhiber l'apoptose au sein des cellules cancéreuses chimiorésistantes. (Brotin et al., 2010) (Simonin et al., 2013)

Le laboratoire Abbvie a développé une molécule BH3-mimétique capable d'inhiber efficacement l'activité de Bcl-x<sub>L</sub>, l'ABT-737, puis son dérivé administrable par voie orale, l'ABT-263, qui fait actuellement l'objet de nombreux essais cliniques de phases I et II seul ou en combinaison. Cependant, bien que l'inhibition directe de Mcl-1 par des BH3-mimétiques soit au cœur de nombreux projets de recherche, aucune molécule n'est actuellement mise sur le marché. Dans ce cadre, une inhibition indirecte par les voies de signalisation qui régulent Mcl-1, comme MAPK/ERK ou PI3K/Akt/mTOR, voies fréquemment dérégulées dans les cancers de l'ovaire, est également envisagée et a déjà montré son efficacité dans de nombreux modèles. (Mabuchi et al., 2015) (Hikita et al., 2010) (Guo et al., 2016) (Somnay et al., 2013) (Gruosso et al., 2015) (Fecteau et al., 2012b). Dans ce contexte, notre équipe a déjà montré avec succès l'inhibition de Mcl-1 *via* l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cancers de l'ovaire. (Jebahi et al., 2014) (Pétigny-Lechartier et al., 2017) Sachant que le calcium est connu pour être dérégulé dans la cancérogenèse et pour moduler les grandes voies contrôlant l'expression de l'expression de Mcl-1, nous nous sommes tournés vers l'étude des effets des inhibiteurs des flux calciques. Ce second messager extrêmement finement régulé est impliqué, en fonction du signal émis, dans les grands processus cellulaires tels que la prolifération, la motilité ou la mort cellulaire. Par ailleurs de nombreuses études mettent en lumière le rôle fondamental des dérégulations des flux calciques dans le processus de cancérogenèse et

montrent que la restauration de ces flux permet d'inhiber ces processus. (Monteith et al., 2017) Ainsi, la surexpression des canaux calciques TRPC3 et TRPV6 a été mise en évidence dans les cancers ovariens. (Yang et al., 2009) (Zhuang et al., 2002) De plus, la modulation des flux calciques module à différents niveaux les voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR connues pour contrôler l'expression de Mcl-1. (Wang et al., 2017) (Rokhlin et al., 2010) (Jiang et al., 2008) (Wong et al., 2017) (Li et al., 2016) Nous nous sommes alors demandé si l'inhibition des flux calciques induisait une inhibition de Mcl-1 et si cette inhibition combinée à un inhibiteur de Bcl-x<sub>L</sub> tel que l'ABT-737 conduisait à restaurer l'apoptose au sein des cellules ovariennes chimiorésistantes.

L'objectif principal de ce projet de recherche était de montrer que l'inhibition de Mcl-1 *via* l'inhibition des flux calciques était une stratégie pertinente dans les cancers ovariens chimiorésistants et que la combinaison avec une stratégie anti-Bcl-x<sub>L</sub> permettait de restaurer l'apoptose au sein de ces cellules. Ceci permettrait alors, après étude de l'expression des canaux calciques dans un panel de cancers ovariens, de cibler précisément des canaux dérégulés et d'élargir l'arsenal thérapeutique visant à inhiber Mcl-1, notamment avec des molécules en développement ou déjà en clinique pour d'autres pathologies.

# Résultats

---

# Publication n°1 :L'inhibition des signaux calciques sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> *via* l'inhibition de Mcl-1.

## Introduction

Les altérations des signaux calciques, liées à des dérégulations des pompes et des canaux calciques, sont impliquées dans le processus de cancérogénèse, permettant alors notamment d'induire des voies de prolifération et d'inhiber la mort cellulaire. (Monteith et al., 2017) Une surexpression des canaux TRPC3 dans des échantillons de cancers épithéliaux de l'ovaire et dans la lignée cancéreuse ovarienne chimiorésistante SKOV3 a d'ailleurs été observée, et cibler cette pompe a un impact sur la prolifération de ces cellules. (Yang et al., 2009)

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux liens existant entre la signalisation calcique et Mcl-1. Tout d'abord, la chélation calcique par le BAPTA-AM conduit à l'inhibition des cibles de l'EGFR que sont ERK, STAT3 et Akt, impliquées dans la régulation de Mcl-1. (Davis et al., 2014) Par ailleurs il a déjà été montré que moduler les flux calciques permet la modulation de Mcl-1, puisqu'une augmentation intracellulaire de calcium provoquée par la thapsigargine induit Mcl-1 et au contraire une inhibition de la CamKII inhibe Mcl-1. (Jiang et al., 2008) (Rokhlin et al., 2010)

L'inhibition de Mcl-1 par l'intermédiaire de la modulation des flux calciques est donc possible, et nous avons voulu mettre en évidence l'inhibition de cette protéine *via* l'inhibition du calcium intracellulaire dans les cellules cancéreuses ovariennes, en vue de les sensibiliser par la suite aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub>.

Pour effectuer cette étude nous avons évalué l'effet de la chélation calcique par le BAPTA-AM sur les lignées de cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes IGROV1-R10 et SKOV3 puis combiné cette molécule à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre Bcl-x<sub>L</sub> et à l'utilisation de l'ABT-737 pour restaurer l'apoptose.

# Calcium signals inhibition sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies through Mcl-1 down-regulation

Marie-Laure Bonnefond · Bernard Lambert ·  
Florence Giffard · Edwige Abeilard · Emilie Brotin ·  
Marie-Hélène Louis · Mor Sény Gueye ·  
Pascal Gauduchon · Laurent Poulain · Monique N'Diaye

Published online: 28 January 2015

© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Ovarian carcinoma is the leading cause of death from gynecologic cancer in the developed world and is characterized by acquired chemoresistance leading to an overall 5-year survival rate of about 30 %. We previously showed that Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 cooperatively protect platinum-resistant ovarian cancer cells from apoptosis. Despite BH3-mimetics represent promising drugs to target Bcl-x<sub>L</sub>, anti-Mcl-1 strategies are still in pre-clinical studies and required new investigations. Calcium is a universal second messenger and dysregulation of calcium signal is often observed during carcinogenesis. As change in cytosolic free calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is known to control the

fate of the cell by regulating Bcl-2 family members, we wonder if calcium signal could impact on Mcl-1 expression and if its pharmacological inhibition could be useful to sensitize ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies. We therefore studied the effect of different calcium signals inhibitors in ovarian carcinoma cell lines SKOV3 and IGROV1-R10 and analysed their effects on proliferation and Mcl-1 expression. We also exposed these cells to these inhibitors in combination with anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies (siRNA or BH3-mimetic: ABT-737). We found that calcium signaling regulates Mcl-1 through translational events and a calmodulin-mediated pathway. BAPTA-AM and calmodulin inhibitor combination with ABT-737 leads to apoptosis, a process that is reversed by Mcl-1 enforced expression. As Mcl-1 represents a crucial hurdle to the success of chemotherapy, these results could open to new area of investigation using calcium modulators to directly or indirectly target Mcl-1 and thus efficiently sensitize ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10495-015-1095-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M.-L. Bonnefond · B. Lambert · F. Giffard · E. Abeilard ·  
E. Brotin · M.-H. Louis · M. S. Gueye · P. Gauduchon ·  
L. Poulain · M. N'Diaye (✉)  
Normandy University, Caen, France  
e-mail: monique.ndiaye@unicaen.fr

M.-L. Bonnefond · B. Lambert · F. Giffard · E. Abeilard ·  
E. Brotin · M.-H. Louis · M. S. Gueye · P. Gauduchon ·  
L. Poulain · M. N'Diaye  
UNICAEN, INSERM U1199 “Biology and Innovative  
Therapeutics of Locally Aggressive Cancers” Unit, Caen, France

M.-L. Bonnefond · B. Lambert · F. Giffard · E. Abeilard ·  
E. Brotin · M.-H. Louis · M. S. Gueye · P. Gauduchon ·  
L. Poulain · M. N'Diaye  
François Baclesse Comprehensive Cancer Center, 3 Avenue du  
Général Harris, BP5026, 14076 Caen Cedex 05, France

B. Lambert  
CNRS (placed at the disposition of EA4656 by CNRS),  
Délégation régionale Ile-de-France Est, 94532 Thiais Cedex,  
France

**Keywords** Ovarian cancer · Calmodulin · Mcl-1 ·  
Calcium signal · mTOR

## Abbreviations

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein
BAPTA-AM	1,2-Bis-( <i>o</i> -Aminophenoxy)-ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intracytosolic calcium concentration
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent kinase II
CREB	C-AMP response element-binding protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF4E	Eukaryotic translation initiator factor 4E
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase

HA14-1	Ethyl [2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)]-4H-chromene-3-carboxylate
MEK	Mitogen-activated protein kinase
mTORC1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
p70S6K	p70 S6 Kinase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PI3 K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PLD	Phospholipase D
SERCA	Sarcoplasmic endoplasmic calcium ATPase
TRP	Transient receptor potential
z-VAD	N-benzyloxycarbonyl-VAD-fluoromethyl ketone

## Introduction

Ovarian cancer causes more than 140 000 deaths worldwide every year, and is the most lethal gynaecological malignancy in developed countries [1]. Standard treatment includes debulking surgery and subsequent platinum-based chemotherapy. Despite good initial response rates, acquired chemoresistance is a critical hurdle in the treatment of cancer and is responsible for relapse and leads to an overall survival rate of about 30 %. One major mode by which cancer cells evade chemotherapy is by an acquired ability to suppress intrinsic pathway of apoptosis [1]. The key regulators of apoptosis are the proteins of the Bcl-2 family which are classified in three groups: the anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1...) that sequester the multi-domain pro-apoptotic members group (Bax and Bak) preventing their oligomerization and subsequent apoptosis. The last group consists of the BH3-only members (Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma...) those possess only the BH3 domain and act as sensors of cellular stress. They initiate apoptosis by either blocking the activity of anti-apoptotic members or directly activating pro-apoptotic members, which is mediated via interaction of the BH3 domain of one protein with the hydrophobic pocket of another [2].

Overexpression of Bcl-2 family members has been observed in a variety of cancers and contributes to chemoresistance. Actually, Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 are often overexpressed in ovarian carcinoma and are associated with poor prognosis in these cancers [3, 4]. Although the down-regulation of either Bcl-x<sub>L</sub> or Mcl-1 remains ineffective, we showed that the concomitant inhibition of these proteins with siRNA was sufficient to induce massive cell death, highlighting the pivotal role these anti-apoptotic proteins

play in chemoresistant ovarian carcinoma and mesothelioma [5].

Several strategies have been developed to overcome Bcl-x<sub>L</sub> and BH3-mimetic drugs represent an exciting development in cancer therapeutics. Among these molecules, ABT-737 is the most promising candidate to clinic. It mimics the direct binding of Bad to Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-w, with a high-affinity ( $K_i < 1$  nM). However, it does not bind to Mcl-1 and Bfl-1 [6] that prevents it to induce cell death in tumor models that overexpress these anti-apoptotic proteins, such as ovarian cancer. Therefore, the use of Mcl-1 targeting agents in combination with BH3-mimetics could constitute an interesting therapeutic strategy in these types of cancers [7].

Many strategies have been developed to counteract Mcl-1 expression or activity such as RNA interference, Noxa overexpression [7] or platinum salts [8]. Mcl-1 is finely regulated and targeting canonical signaling pathways with kinases inhibitors such as PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK inhibitors gave promising results and strongly sensitized cancer cells to ABT-737 [9, 10]. Concomitant inhibition of these pathways is however required to avoid molecular crosstalks and to induce massive apoptosis [11]. The complexity of pathways controlling Mcl-1 and their interconnectivity encourage research to find other networks that could have a therapeutic interest.

Calcium is a universal second messenger that regulates a number of diverse cellular processes including cell proliferation, apoptosis, motility and secretion. The versatility of the signals is most strikingly exemplified by their role in life-and-death decisions. Consequently,  $[Ca^{2+}]_i$  needs to be used in an appropriate manner to determine cell fate; if calcium signals are compromised, pathologies as carcinogenesis may occur. Actually, modifications of calcium pumps and channels are regularly observed in cancer and have impact on cellular proliferation by activating survival pathway or preventing apoptosis [12]. For example, inhibition of calcium permeable TRPC3 (transient receptor potential canonical type-3) channels, which are elevated in clinical epithelial ovarian cancer samples, reduces the proliferation of SKOV3 ovarian cancer cells [13]. The impact of  $[Ca^{2+}]_i$  on apoptosis regulation could be explained by the tight relation between calcium homeostasis and Bcl-2 family members. Indeed, it has been described that anti-apoptotic members reduced apoptotic signals by allowing continuous calcium leak through endoplasmic reticulum leading to a reduced in amplitude calcium signal which prevented apoptosis trigger. On the contrary, calcium signal can modulate these proteins expression and increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was described to induce Bcl-2 expression through CREB (Calcium Response Element Binding protein) activation [14].

Several scattered examples suggest that calcium signaling has an impact on Mcl-1 expression. Indeed, calcium chelation leads to inhibition of EGFR targets (STAT3, AKT, ERK 1/2) that are known to regulate Mcl-1 [15]. Moreover, thapsigargin which increase intracellular calcium concentration via SERCA inhibition induces Mcl-1 expression in melanoma [16]. At last, KN93 a specific calmodulin kinase inhibitor, decreases Mcl-1 expression in prostate cell lines [17]. Here, we tested if calcium signaling pathway inhibition could have an impact on Mcl-1 expression in chemoresistant ovarian carcinoma cells and we evaluated the impact of its combination with anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

## Materials and methods

### Cell culture

SKOV3 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, USA). Resistant IGROV1-R10 cells were obtained by reiterating treatments with increasing concentrations of cisplatin as previously described [10]. Cell lines were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM Glutamax<sup>TM</sup>, 25 mM HEPES, 10 % fetal calf serum, and 33 mM sodium bicarbonate (Fisher Scientific Bioblock, France). Cells were maintained in a 5 % CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37 °C.

### Reagents

ABT-737 was purchased by Selleckem (Souffelweyersheim, France) and BAPTA-AM was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). W7, KN93, FIPI and z-VAD were provided by Tocris (R&D Systems, Lille, France). These compounds were commonly stored as stock solutions in DMSO at –20 °C. Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) was supplied by Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA, USA).

### Proliferation analysis

Cell number and viability were estimated by a semi-automated image-based cell analyzer (Cedex XS Analyzer, Roche Applied Science, Meylan, France) using the Trypan blue exclusion method.

### Cell cycle analysis by flow cytometry

Adherent and floating cells were pooled, washed with phosphate-buffered saline (PBS 1X) and fixed with ethanol 70 %. Cells were then centrifuged at 2,000 r.p.m. for 5 min and incubated for 30 min at 37 °C in PBS 1X, to allow the

release of low-molecular weight DNA. Cell pellets were stained with propidium iodide using the DNA Prep Coulter Reagent Kit (Beckman-Coulter, France). Samples were analysed using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, France).

### Western-immunoblotting

Cells were rinsed with ice-cold PBS 1X and lysed in RIPA buffer as previously described [8]. After centrifugation, proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, CA). 30 µg of proteins were separated by SDS–PAGE (Biorad, France) and transferred to PVDF-membranes (Millipore, France). After blocking, membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology, France), anti-Noxa (Calbiochem, France), anti-Bcl-2 (DAKO, France), anti-actin (Sigma, Saint Louis, USA), anti-Bcl-x<sub>L</sub>, PARP, Bim, caspase-3, p-AKT(thr308), p-AKT(ser473), AKT, p-ERK(Thr202/Tyr204), ERK, p-4E-BP1(Thr70), 4E-BP1, p-p70S6K(Thr389) and p70S6K (Cell Signaling Technology, Ozyme, France). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare, France). Revelation was done using ECL Prime Western Blot detection reagent (GE Healthcare, France).

### RNA extraction and real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA were isolated from ovarian carcinoma cell lines using Trizol (Invitrogen, Life Technologies, France). RNA quantity and quality were assessed using the NanoDrop<sup>TM</sup> 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, France). The first strand cDNA was synthesized using Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen, France) with random hexamers. cDNA (25 ng) were combined with 10 µmol/l of each forward and reverse primers, 50 µmol/l of the TaqMan<sup>®</sup> probe and TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a 20 µl final reaction volume. Corresponding custom inventoried (ID: Hs00172036\_m1 for Mcl-1 and Hs99999905\_m1 for GAPDH) TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays were used (Applied Biosystems). All PCR amplification reactions were carried out in triplicate and detection was done on an Applied ABI Prism 7500 Fast PCR system (Applied Biosystems). GAPDH was used as a housekeeping reference gene for normalization.

### siRNA transfection

PAGE purified siRNAs were synthesized and annealed by the Eurogentec Company (Liège, Belgium). Specific



double-stranded 21 nt RNA oligonucleotides forming a 19 bp duplex core with 2 nt 3' overhangs were used to silence Bcl-x<sub>L</sub> expression (5'-auuggugagucggaucgca-3', noted siXL). siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#1 (noted siCT) was purchased from Dharmacon. siRNA duplexes were transfected using the INTERFERin™ transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus-Transfection, France). Briefly, cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks to reach 30–50 % of confluence at the time of transfection. The transfection reagent and the siRNAs were mixed and complex formation was allowed to proceed for 15 min at room temperature before to be applied to cells. After indicated time, cells were trypsinized and washed with ice-cold PBS 1X before to be analyzed.

#### Plasmid construction and transfection

The MCL1 ORF (NM\_021960.4, +209 to +1298) was amplified from IGROV-R10 cDNA by PCR using restriction enzyme containing-primers (sense 5' TTAAGCTTATGTTTGGCCTCAAAGAAA3'; antisens 5' GGTCTAGA GGTTGGTTAAAAGTCAACTATTGC 3'). The EIF4E ORF (NM\_001968, +1519 to +2222) was amplified from IGROV-R10 cDNA by PCR using restriction enzyme containing-primers (sense 5' AACAAAGCTTCTAAGATGGCGACTGTGCGAA 3'; antisens 5' AACAAAGCTTCTAAGATGGCGACTGTGCGAA 3'). The amplified ORF were restricted with HindIII and XbaI and cloned between the corresponding restriction sites of the mammalian expression vector pcDNA3.1. The sequences of the construction were checked. Empty vector pcDNA (named "Empty") and Vector containing MCL1 ORF or EIF4E (named "Mcl-1" and "eIF4E" respectively) were transfected using Jet-Prime DNA transfecting agent (Polyplus-Transfection, France) as described by manufacturer.

#### Real-time cellular cytotoxicity assay (xCELLigence)

Compound-mediated cytotoxicity was monitored using Real-Time Cell Analyzer Multi-Plate (RTCA MP) Instrument, xCELLigence System (ACEA, Ozyme, France). The system monitors cellular events in real time measuring electrical impedance across interdigitated micro-electrodes integrated on the bottom of tissue culture E-plates View. The increase in the number and size of cells attached to the electrode sensors leads to increased impedance, from which derive the cell index (CI) values displayed at the plot, reflecting changes in cell viability. Briefly, 96-well E-Plates were seeded and placed onto the RTCA MP in a tissue culture incubator. Treatments were realized 24 h

later and impedance was continuously measured. Standard deviations of well replicates were analyzed with the RTCA Software.

#### Statistical analysis

Relative values were compared to the value of the control condition by a one-sample Student's *t* test.

## Results

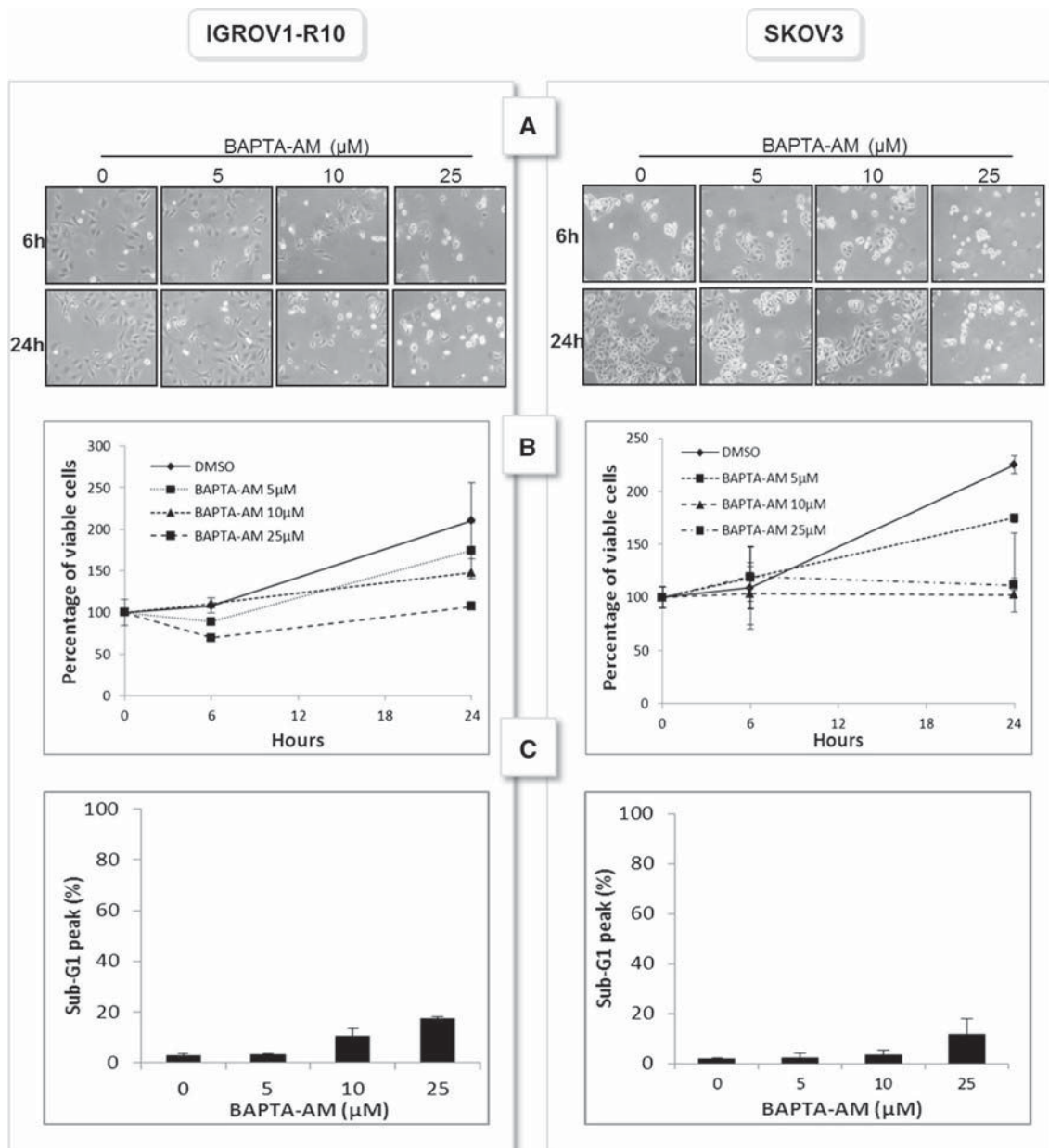
### Cytostatic effect of calcium chelator BAPTA-AM

SKOV3 and IGROV1-R10 were treated with increasing concentrations of BAPTA-AM for 6 and 24 h. Results revealed that BAPTA-AM had a dose dependent anti-proliferative effect that appeared from the dose of 10 μM as assessed by morphological features and cell viability for the two lines tested (Fig. 1a, b). The strongest dose tested (25 μM) induced shape modification of cells that became rounded and this effect was observable as soon as 6 h of treatment. Increase in sub-G1 peak was dose-dependent but remains modest even for the highest concentration of BAPTA-AM tested (Fig. 1c).

### BAPTA-AM inhibits Mcl-1 expression

IGROV1-R10 and SKOV3 were then treated with increasing doses of BAPTA-AM (0, 5, 10, 25 μM) for 6 h and expression of Bcl-2 family members were analyzed upon this treatment. A deep decrease of Mcl-1 expression appeared from 10 μM in both cell lines (Fig. 2a). Concerning the other members of Bcl-2 family, Bcl-2 was not expressed in IGROV1-R10 and Bim not expressed in SKOV3 cells as previously described [8] however their expression were not modified in the cell line where they are present. As for Puma, this BH3-only was very slightly expressed in IGROV1-R10 cells and its expression also dose-dependently decreased upon BAPTA-AM treatment. This protein was not detected in SKOV3 cells in our conditions. Noxa was detected in both cell lines and its expression was dose-dependently decreased upon BAPTA-AM treatment.

No PARP cleavage was observed confirming that BAPTA-AM did not induced apoptosis. A time-course experiment with 10 μM BAPTA-AM revealed that Mcl-1 expression dramatically decreased within 6 h but its expression is partially recovered for longer treatment indicating that BAPTA-AM effect is transient (Fig. 2b).



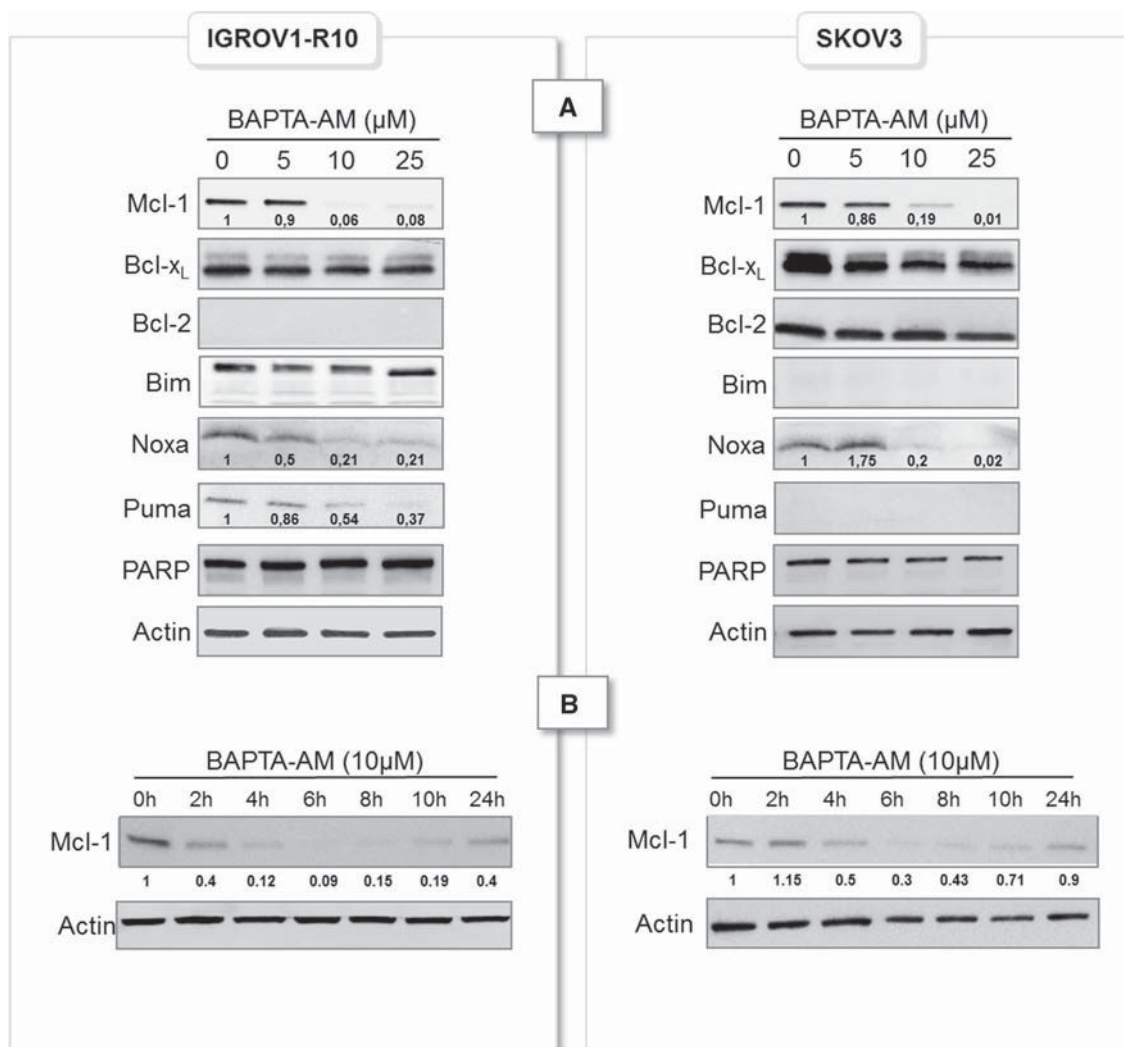
**Fig. 1** Cytostatic effect of calcium chelator BAPTA-AM. IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with increasing concentrations of BAPTA-AM for 6 and 24 h. Response was appreciated by **a** morphological features **b** cell viability (assessed

by the percentage of cell viability with respect to number of viable cells at 0 h) **c** assessment of sub-G1 peak (24 h). Data are representative of three independent experiments

BAPTA-AM-induced Mcl-1 decrease does not result from transcriptional and post-translational events but is associated with mTORC1 pathway inhibition

To decipher the mechanism underlying Mcl-1 down-regulation by calcium inhibition, Mcl-1 mRNA expression in SKOV3 and IGROV1-R10 cells was quantified using RT-qPCR. Treatment of cells with 10  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM for 6 h did not significantly altered Mcl-1 at mRNA level

(Fig. 3a), suggesting that calcium signal inhibition induced Mcl-1 down-regulation through transcription-independent mechanism. We then tested the involvement of caspase on Mcl-1 stability as Mcl-1 could be degraded by activated caspase 3 [18]. Cells were treated with BAPTA-AM for 6 h and pro- and cleaved- caspase 3 expressions were assessed. No cleavage of caspase 3 was observed allowing us to exclude involvement of caspase in BAPTA-AM-induced Mcl-1 decrease (Fig. 3b).



**Fig. 2** Dose-response and time course of BAPTA-AM-induced Mcl-1 decrease. **a** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with increasing concentrations of BAPTA-AM for 6 h and expressions of Bcl-2 family members were appreciated by western blot and Mcl-1, Noxa and Puma expressions were quantified by Image J software. **b** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated with

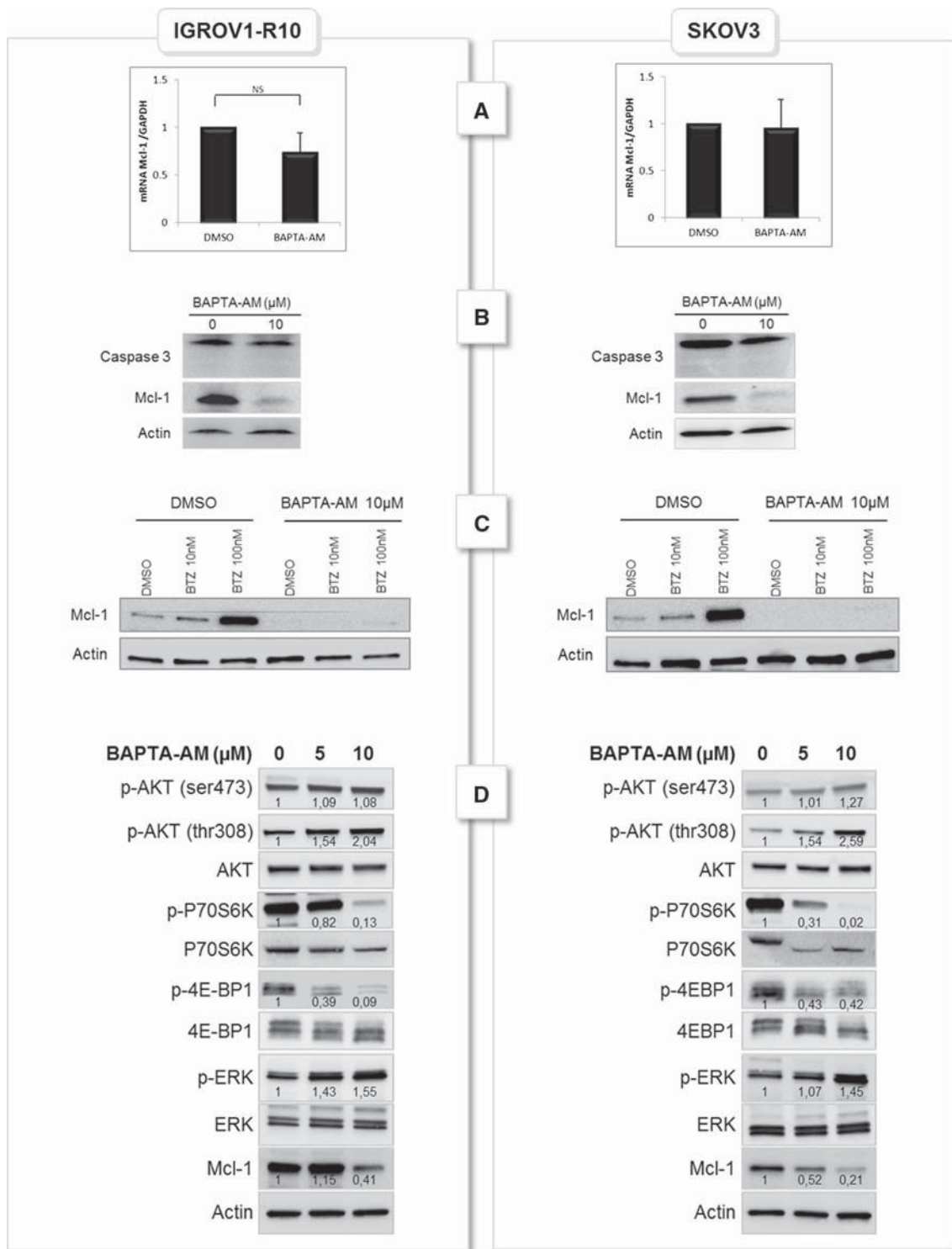
10 μM BAPTA-AM from 0 to 24 h. Expression of Mcl-1 was assessed by western blot. Data are representative of three independent experiments. Mcl-1 expression was quantified by Image J software. The relative intensity of each lane was calculated with respect to the sample at 0 h

To analyse if Mcl-1 decrease upon BAPTA-AM treatment involves proteasomal degradation, we incubated ovarian carcinoma cells with bortezomib, a proteasome inhibitor, for 1 h and then treated cells with BAPTA-AM for 6 h. As assessed in Fig. 3c, bortezomib dose-dependently prevented Mcl-1 degradation in SKOV3 and IGROV1-R10 cells. However, this pre-treatment did not prevent the loss of Mcl-1 induced by intracellular calcium chelation, ruling out the involvement of posttranslational events in BAPTA-AM-induced Mcl-1 decrease and strongly suggesting translational events.

To further elucidate mechanisms by which BAPTA-AM might inhibit Mcl-1 translation, we studied the activation of AKT/mTOR pathway. This pathway is the most

frequently deregulated pathway in ovarian cancer and it is also known to regulate Mcl-1 translation focusing research to target this network in order to sensitize cancer cells [19]. Results showed that BAPTA-AM had no impact on p-AKT(ser473) but dose-dependently increased p-AKT(thr308) as quantifies by densitometry (Fig. 3D). On the contrary, mTORC1 targets, p-4E-BP1 and p-p70S6K were dose-dependently dephosphorylated in the two cell lines. This result suggests that calcium chelation could inhibit Mcl-1 translation via mTOR pathway inhibition in our models.

Mcl-1 could also be regulated by mitogen activated protein kinase (MAPK) as ERK 1/2 either by transcriptional or by post-translational events both leading to an



**Fig. 3** BAPTA-AM-induced Mcl-1 decrease does not result from transcriptional and post-translational events but is associated with mTORC1 pathway down-regulation. IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with 10 μM BAPTA-AM for 6 h. **a** Mcl-1 mRNA level was determined by real time quantitative RT-PCR, **b** PARP and Caspase 3 cleavages were assessed by western blot, **c** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were pre-treated 1 h with DMSO, 10 or 100 nM bortezomib. Then cells were treated or not (DMSO)

with 10 μM BAPTA-AM for 6 h. Expression of Mcl-1 was followed by western blot. Data are representative of three independent experiments. **d** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with 5 and 10 μM BAPTA-AM for 6 h. AKT/mTOR as well as MAPK pathways were assessed for each condition and proteins expressions were quantified by Image J software. Data are representative of three independent experiments

up-regulation of the anti-apoptotic protein [18]. In order to investigate if Mcl-1 down-regulation was a consequence of p-ERK down-regulation by BAPTA-AM, we evaluated ERK phosphorylation status upon BAPTA-AM treatment. As depicted in western blots,  $[Ca^{2+}]_i$  inhibition led to an increase p-ERK 1/2 expression (1.5×) in both cell lines tested allowing us to rule out involvement of ERK in Mcl-1 down-regulation.

Calcium chelation combined with anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies leads to apoptosis in ovarian carcinoma

As Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 cooperates to prevent ovarian carcinoma cells from apoptosis, we next evaluated the efficacy of BAPTA-AM/anti-Bclx<sub>L</sub> strategies combinations.

First, we combined BAPTA-AM with the BH3-mimetic ABT-737. We co-treated ovarian carcinoma cells with the two molecules and analysed cell viability by xCELLigence Technology (Fig. 4a). Results showed that treatment with ABT-737 or BAPTA-AM alone slowed down SKOV3 and IGROV1-R10 proliferation compared to DMSO treatment. Conversely, combination of these drugs led to a dramatic drop in cell index (CI). Actually, CI fell to 0 with 6 h of treatment for both ovarian cell lines. This effect is correlated with appearance of floating cells (Fig. 4b), a strong increase of sub-G1 peak (36 % for IGROV1-R10 and 25 % for SKOV3 cells after 24 h of treatment, Fig. 4c) and a dramatic decrease in cell viability (48 % for IGROV1-R10 and 67 % for SKOV3 cells, Fig. 4d). These events were accompanied by caspase 3 and PARP cleavages (Fig. 4e).

To confirm this result, we combined BAPTA-AM with siRNA targeting Bcl-x<sub>L</sub> (siXL) (Supp data 1A). For this purpose, SKOV3 and IGROV1-R10 cells transfected with siXL for 48 h and then treated with 10 μM BAPTA-AM. The treatments efficacy was followed by xCELLigence Technology. Results showed a dramatic decrease of cell index upon siXL/BAPTA-AM treatment in IGROV1-R10 cells and to a lesser extent in SKOV3 cells. Cell culture was also carried out and cells were transfected 48 h with siRNA and then treated 6 h with BAPTA-AM. Results revealed that whereas a modest apoptosis was obtained with siXL (siXL+DMSO) or BAPTA-AM (siCT+BAPTA-AM) alone, a massive cell death appeared with siXL/BAPTA-AM combination as assessed by morphological features (Supp data 1B). Moreover siXL/BAPTA-AM combination led to a strong increase of sub-G1 peak (57 % for IGROV1-R10 and 30 % for SKOV3 cells Supp data 1C) and a dramatic decrease in cell viability (49 % for IGROV1-R10 and 54 % for SKOV3 cells Supp data 1D) and to PARP and Caspase 3 cleavages (Supp data 1E).

To verify that caspases were involved in BAPTA-AM+ABT-737 combination-induced apoptosis, we pre-treated SKOV3 cell line with a pan caspase inhibitor

z-VAD and then exposed cell to the combination of drugs for 6 h. As depicted in Supp. data 2, the strong sub-G1 peak and caspase 3 cleavage induced by this combination were totally abolished upon z-VAD pre-treatment.

PLD inhibition does not trigger Mcl-1 down-regulation

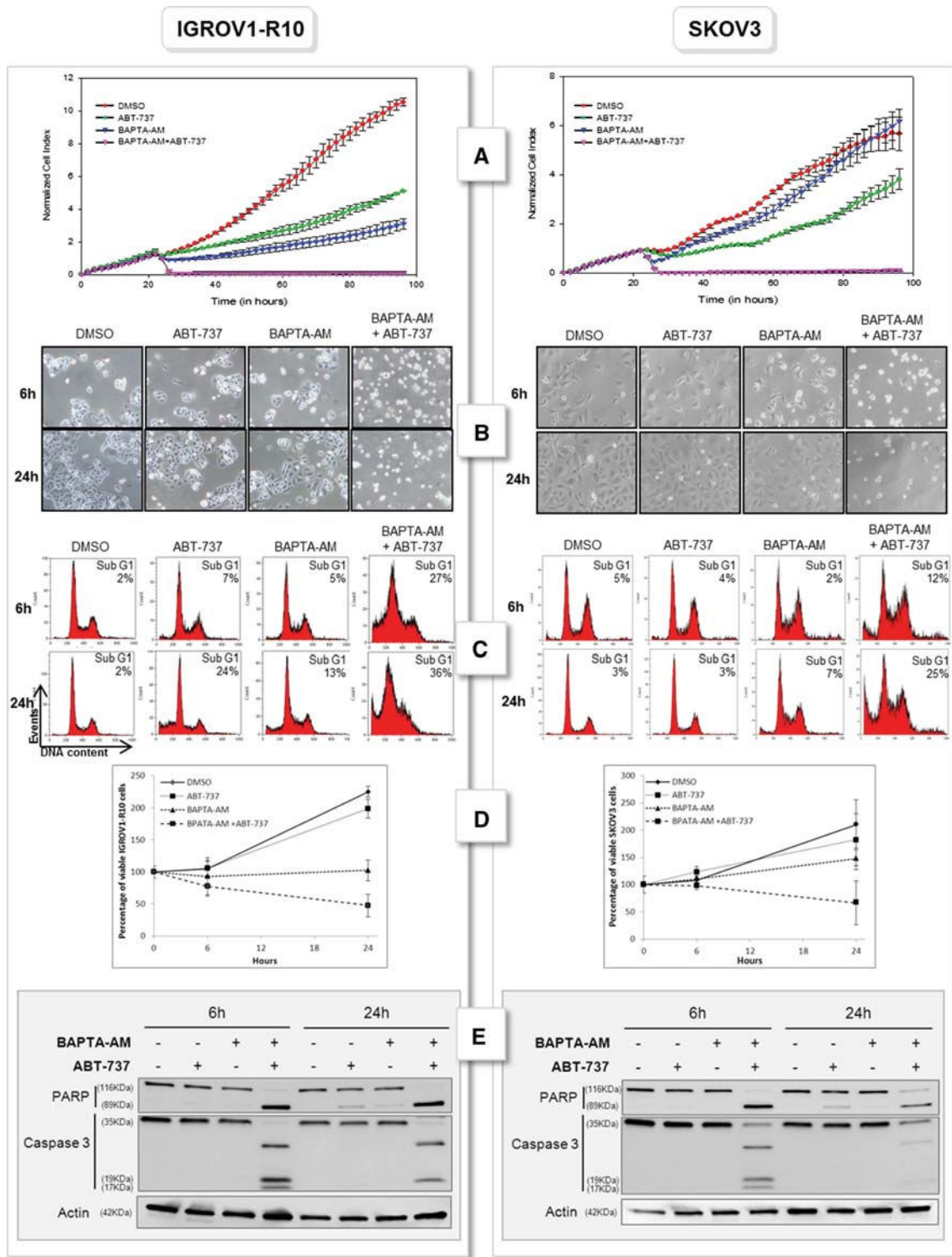
In order to decipher the molecular pathways that could connect  $[Ca^{2+}]_i$  and Mcl-1, we tested the effect of inhibitors of proteins known to be regulated by  $[Ca^{2+}]_i$  on Mcl-1 expression.

As Ballou and coworkers described in RAT-1 fibroblasts, an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  can lead to PLD activation that in turn could activate mTOR and its downstream targets 4E-BP1 and p70S6K [20]. It could then be hypothesized that inhibiting PLD could lead to Mcl-1 inhibition in our models. To answer this question, we treated ovarian carcinoma cells with increasing concentrations of 5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI) a PLD pharmacological inhibitor for 6 and 24 h. The results presented in Supp. data 3A and 3B showed that FIPI did not modify Mcl-1 expression whatever the time and the FIPI concentration considered. Besides, a 6-h treatment with FIPI had no effect on AKT, mTOR, p70S6K and 4E-BP1 phosphorylations (Supp. data 3A). Moreover, FIPI combination with ABT-737 was also performed in IGROV1-R10 and SKOV3 cells lines and followed with xCELLigence technology (Supp. data 3C). Results revealed that FIPI+ABT-737 treatment only slowed down the proliferation of carcinoma cells lines but had not a cytotoxic effect. These results suggest that the calcium/PLD/mTOR pathway does not seem to be involved in Mcl-1 regulation.

W7, a calmodulin inhibitor, decreases Mcl-1 expression and its combination with ABT-737 is cytotoxic

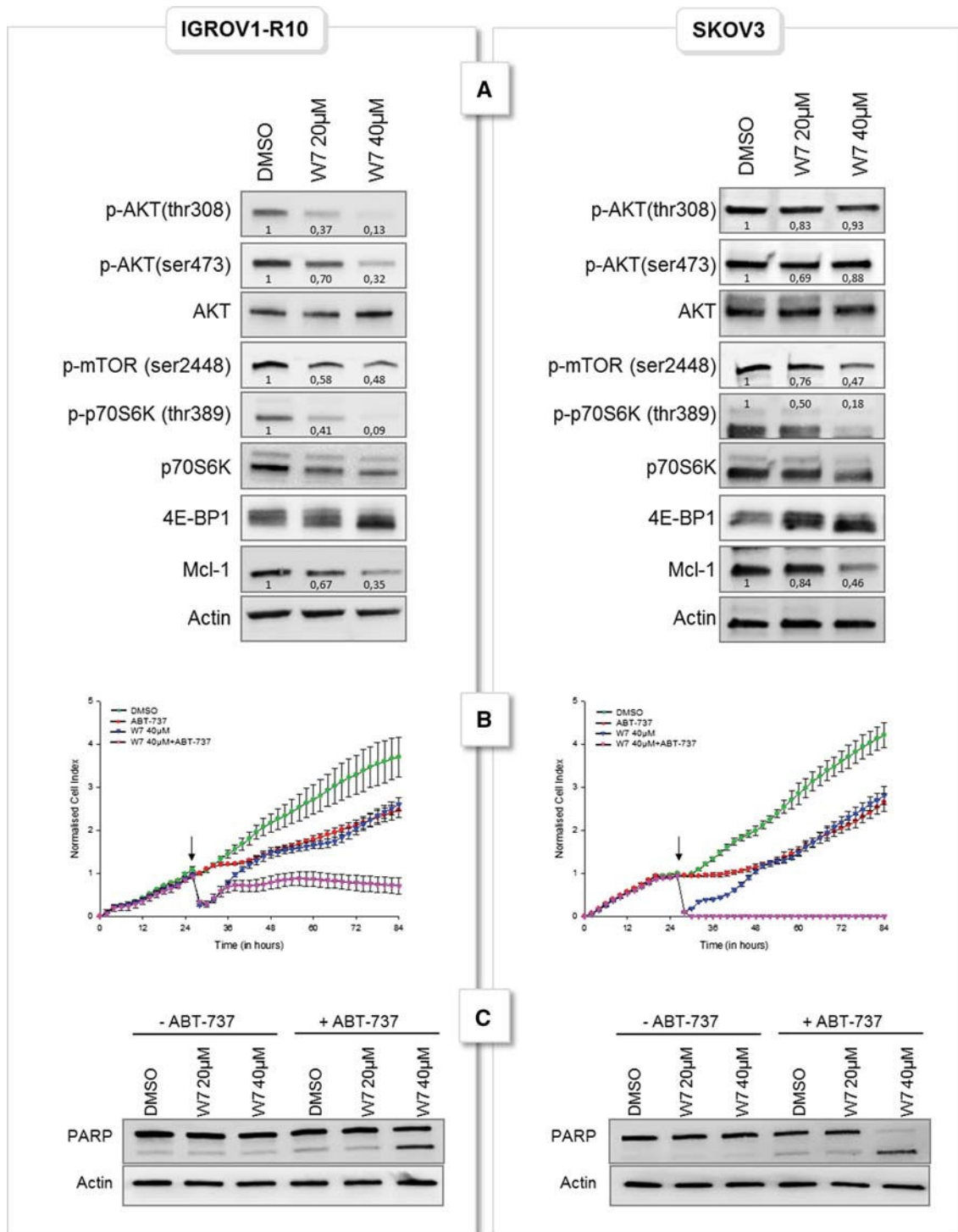
To further examine whether calcium mediates its effect on Mcl-1 through the calcium sensor calmodulin, we used a selective calmodulin antagonist, W7. As shown in Fig. 5a, 3-h treatment with W7 dose dependently decreased Mcl-1 expression in both cell lines. This effect was accompanied with a decrease of mTOR, p70S6K and 4E-BP1 phosphorylation. W7 also caused significant inhibition of AKT (thr308) and (Ser473) phosphorylations in IGROV1-R10 cells whereas it had not effect on AKT phosphorylation in SKOV3 cells.

Then, we combined W7 with the BH3-mimetic ABT-737 and analysed cell viability by xCELLigence Technology (Fig. 5b). Results showed that treatment with 10 μM ABT-737 or 40 μM W7 alone slowed down SKOV3 and IGROV1-R10 proliferation compared to DMSO treatment. Conversely, combination of these drugs led to a dramatic drop in cell index. To confirm this result,



**Fig. 4** Calcium chelation combined with ABT-737 leads to apoptosis in ovarian carcinoma. **a** Real time analysis of cellular cytotoxicity of ABT-737/BAPTA-AM combination. Histogram was obtained using the xCELLigence System as described in “Materials and methods” section. Cells were grown for 24 h and then treated or not (DMSO) with 10  $\mu$ M ABT-737 in presence or not (DMSO) of 10  $\mu$ M BAPTA-AM. Cell index was recorded every 2 h, with displayed standard error

bars. IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with 10  $\mu$ M ABT-737 in presence or not (DMSO) of 10  $\mu$ M BAPTA-AM for 6 and 24 h. **b** Morphological features and **c** DNA contents were studied for each condition. **d** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion at 24 h. **e** PARP and caspase 3 cleavages were studied by western-blot. Data are representative of three independent experiments



**Fig. 5** Calmodulin antagonist W7 inhibits Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. **a** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with increasing concentrations of W7 for 3 h and expressions of Mcl-1 and AKT/mTOR pathway were appreciated by western blot and proteins expressions were quantified by Image J software. Data are representative of three independent experiments. **b** Real time analysis of cellular cytotoxicity of ABT-737/W7 combination. Histogram was obtained using the

xCELLigence System as described in “Materials and methods” section. Cells were grown for 24 h and then treated or not (DMSO) with 10 µM ABT-737 in presence or not (DMSO) of 40 µM W7. Cell index was recorded every 2 h, with displayed standard error bars. **c** IGROV1-R10 and SKOV3 cells were treated or not (DMSO) with 10 µM ABT-737 in presence or not (DMSO) of increasing concentrations of W7 for 24 h. PARP cleavage was studied by western-blot. Data are representative of three independent experiments

we treated cells this W7+ABT-737 combination and observed a strong apoptosis assessed by a decrease of cell viability, increase of sub-G1 peak (data not shown) and appearance of PARP cleavage (Fig. 5c).

Calcium-calmodulin dependent kinase II (CamKII) is not involved in Mcl-1 down-regulation

Ca(2+)/CaM binds and activates a plethora of enzymes, including Calcium/calmodulin-dependent kinase II (CamKII), calmodulin kinase kinases (CamKK) or AKT [21]. CamKII is ubiquitously expressed and mediated diverse physiological response to increases in  $[Ca^{2+}]_i$  by virtue of its activation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and auto-phosphorylation. CamKII is actually known to activate AKT/mTOR pathway and was demonstrated to down-regulate Mcl-1 in prostate cancer cells [17]. To test the potential involvement of CamKII in Mcl-1 down-regulation in our models, we treated ovarian cell lines with a well-known CamKII inhibitor, KN93. For this purpose, ovarian carcinoma cells were treated with increasing concentration of KN93 for 6 h. Mcl-1 and AKT/mTOR activation were then assessed by western blot and results revealed that KN93 has a modest effect on Mcl-1 (0.93× and 0.82× for 10 μM KN93 in IGROV1-R10 and SKOV3 respectively) and has a modest effect on AKT phosphorylation leading to the conclusion that a calcium/calmodulin/CAMKII pathway does not seem to be involved in Mcl-1 regulation in the conditions tested.

Enforced expression of Mcl-1 and eIF4E rescue ovarian carcinoma cells from apoptosis triggered by calcium inhibitors + ABT-737 combinations

In order to assess that down-regulation of Mcl-1 plays a central role in calcium inhibitors + ABT-737-induced apoptosis, we combined BAPTA-AM and W7 with ABT-737 in IGROV1-R10 cells overexpressing or not Mcl-1. Cells were transfected 40 h with empty pcDNA (Empty) or pcDNA containing Mcl-1 cDNA sequence (Mcl-1) as described in “Materials and methods” section and then treated with each combination for 24 h. Results presented in Fig. 6 suggest that enforced expression of Mcl-1 partially rescues ovarian carcinoma cell from calcium inhibitors + ABT-737-induced cytotoxicity as assessed by the decrease of the percentage of sub-G1 peak (45 vs 28 % for BAPTA-AM+ABT-737 condition and 61 vs 40 % W7+ABT-737 condition) (Fig. 6a), the increase of IGROV1-R10 cell viability (36 vs 66.5 % for BAPTA-AM+ABT-737 condition and 32 vs 53 % W7+ABT-737 condition) (Fig. 6b) and the reduction of Caspase 3 cleavage (Fig. 6c).

To confirm that BAPTA-AM and calmodulin regulate Mcl-1 through mTORC1 pathway, we overexpressed 4E-BP1

target eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E). Actually, inactivation of the translational repressor 4E-BP1 by phosphorylation facilitates the detachment and subsequent phosphorylation of eIF4E. Phosphorylated eIF4E in turn forms a complex with eIF4A and eIF4G, which enables the translation of cap-dependent mRNA for proteins like Mcl-1 [22]. Cells were transfected 40 h with empty pcDNA (Empty) or pcDNA containing eIF4E cDNA sequence (eIF4E) and then treated with BAPTA-AM or W7+ABT-737 for 24 h. As presented in Fig. 6, enforced expression of eIF4E partially rescues ovarian carcinoma cell from calcium inhibitors + ABT-737-induced cytotoxicity as assessed by the decrease of the percentage of sub-G1 peak (48.6 vs 31.7 % for BAPTA-AM+ABT-737 condition and 52.3 vs 41.8 % W7+ABT-737 condition) (Fig. 6d), the increase of IGROV1-R10 cell viability (43.4 vs 66.3 % for BAPTA-AM+ABT-737 condition and 47.1 vs 65.7 % W7+ABT-737 condition) (Fig. 6e), an increase in Mcl-1 expression (1.5× in average) and the reduction of Caspase 3 and PARP cleavages (Fig. 6f).

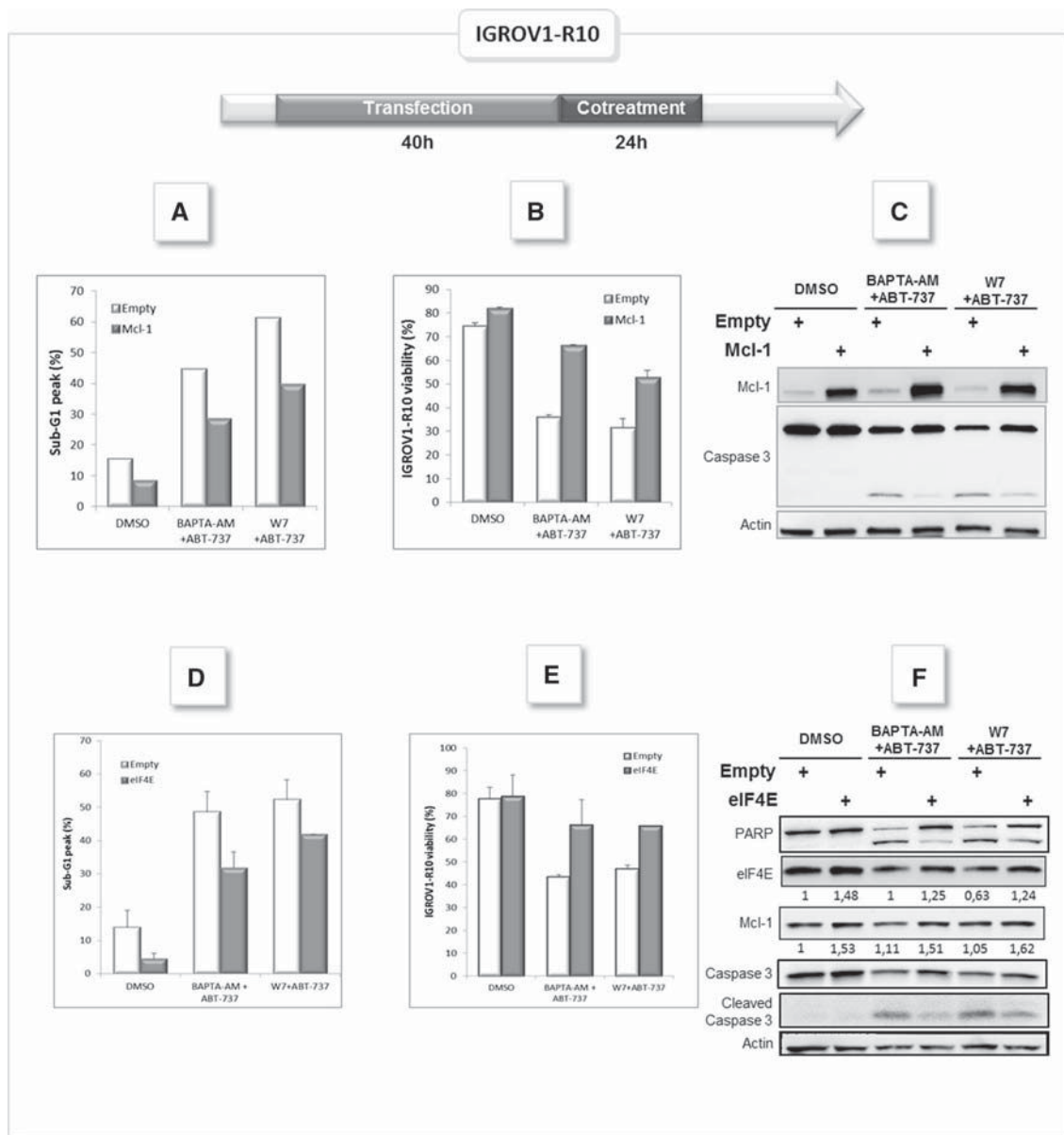
## Discussion

In this study, we showed that BAPTA-AM had an anti-proliferative effect on its own from the dose of 10 μM. For the strongest concentration (25 μM) this effect was accompanied with morphological changes of cells that become rounded within 6 h of treatment. This loss of spindle-shape morphology with BAPTA-AM was also seen in breast cancer cells where this chelator promoted N-cadherin inhibition thereby preventing the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF [15].

BAPTA-AM treatment induced a strong inhibition of Mcl-1 expression. However response duration is short as Mcl-1 expression move back up after 24 h treatment. This could be due to BAPTA-AM degradation or to the extremely rapid turnover of Mcl-1. Actually Mcl-1 half-life is about 2 h and we previously demonstrated that in our model, its half-life was about 40 min [8] that could overcome BAPTA-AM action. Mcl-1 down-regulation was accompanied by a reduction in Noxa expression. This result was also observed when Mcl-1 is inhibited by AZD8055 [23] or silenced by siRNA mechanism in ovarian carcinoma cells [8] and melanoma cell lines [24] however further studies are required to understand this mechanism.

Mcl-1's own Achilles' Heel may lie in its tight regulation and because calcium can affect multiple pathways, we sought how it impacts on Mcl-1 expression. As induction of  $[Ca^{2+}]_i$  by thapsigargin has been described to increase Mcl-1 transcription in melanoma [16], we evaluated if calcium modulation could target Mcl-1 transcription in our models; however results suggest that this mechanism does not seem to be involved in ovarian carcinoma cells.





**Fig. 6** Mcl-1 enforced expression rescue ovarian carcinoma cells from apoptosis triggered by BAPTA-AM/ABT-737 or W7/ABT-737 combinations. IGROV1-R10 cells were transfected with empty plasmid pcDNA (Empty) or pcDNA containing Mcl-1 ORF (Mcl-1) for 40 h as described in “Materials and methods” section. Then cell were treated with DMSO or cotreated either with 10  $\mu$ M BAPTA-AM and 10  $\mu$ M ABT-737 or 40  $\mu$ M W7 and 10  $\mu$ M ABT-737 for 24 h. **a** DNA contents were studied for each condition. **b** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. **c** Mcl-1 expression and Caspase 3

cleavage were studied by western-blot. IGROV1-R10 cells were transfected with empty plasmid pcDNA (Empty) or pcDNA containing EIF4E ORF (eIF4E) for 40 h as described in “Materials and methods” section. Then cell were treated with DMSO or cotreated either with 10  $\mu$ M BAPTA-AM and 10  $\mu$ M ABT-737 or 40  $\mu$ M W7 and 10  $\mu$ M ABT-737 for 24 h. **d** DNA contents were studied for each condition. **e** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. **f** Mcl-1, eIF4E expression and PARP and Caspase 3 cleavage were studied by western-blot

Mcl-1 down-regulation can also be triggered by two post-translational pathways. The first one was attributed to the proteasome after ubiquitination by Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3 (MULE) or beta transducin-containing protein (beta-TrCP). Secondly, Mcl-1 is known to be additionally subject to non-proteasomal degradation and cleaved by caspase 3 at two sites within the N-terminus [18].

However, in our condition neither proteasomal nor caspase 3 degradation were involved in Mcl-1 inhibition and this strongly supports that BAPTA-AM down-regulates Mcl-1 through translational events.

We therefore analyzed if this effect could imply the canonical PI3K/AKT/mTOR pathway that is the most frequently deregulated pathway in high grade serous

ovarian cancer. This pathway is all the more interesting that it is known to regulate Mcl-1 translation and is targeted in this way to sensitize several types of cancer justifying the development of pharmacological PI3K/AKT/mTOR inhibitors [10, 19, 25]. Moreover, potential connections between calcium signaling and PI3K/AKT/mTOR pathway have been reported in a number of cell types included ovarian cancer [15, 26, 27]. Results showed that inhibition of Mcl-1 by BAPTA-AM was accompanied by a dramatic p-4E-BP1 and p-p70S6K down-regulation. These proteins are considered as the two most prominent and well-characterized translational regulators activated by mTORC1 and a growing body of evidence suggests that deregulation in protein synthesis has impact on cancer cell survival. In this way, loss of 4E-BP1 phosphorylation has previously been shown to result in a decrease of Mcl-1 protein expression in various cancer types *in vitro* and *in vivo* leading to therapeutic benefit [19, 22] and overexpression of eIF4E led to Mcl-1 expression in our models. Our findings suggest that calcium inhibition act on the PI3K/AKT pathway as an mTORC1 inhibitor. This is all the more highlighted because this compound, by inhibiting p70S6K, reactivate PI3K which leads to an increase of p-AKT(Thr308). However, our study suggests that calcium inhibition does not act as a classical allosteric mTORC1 inhibitors as rapamycin. Indeed, these latter compounds have been described to poorly inhibit 4E-BP1 phosphorylation and not to target mTORC2 thus leading to an up-regulation of p-AKT(Ser473) by a compensatory feedback loop [28]. Yet, p-4E-BP1 expression was strongly inhibited upon BAPTA-AM treatment especially in IGROV1-R10 cells but no increase of p-AKT(Ser473) was observed in both ovarian cell lines. This latter result was in agreement with those obtained in human breast cancer cells by Davis FM and coworkers [15]. One could suggest that calcium inhibition act as ATP-competitive inhibitors of mTOR that block the phosphorylation of all downstream targets of mTORC1 and mTORC2 [29]. However, these compounds are known to strongly inhibit p-AKT(Ser473) phosphorylation that it is not observed in our models [30, 31].

Concerning RAS/MEK/ERK network, it is known to interfere with PI3K/AKT pathway and regulate mTORC1 activity [32]. It has also been demonstrated that MAPK inhibition led to Mcl-1 down-regulation that sensitized acute myeloid leukemia to ABT-737 action [9]. However, in our conditions, p-ERK was not decreased upon BAPTA-AM treatment but is increased. This effect could be triggered by a negative feedback loop due to mTORC1 inhibition that hyperactivate RTK/IRS/PI3K pathway as reported by Carracedo et al., [30]. This is suggested in our study by the increase of AKT phosphorylation in Thr308. BAPTA-AM induced ERK phosphorylation could also be triggered by calcium dependent regulation of mitogen-activated protein kinase

phosphatases, as proposed by Davis FM and coworkers [15]. ERK was described to either to favor cell proliferation or to trigger cell death depending on cell types and stimulus [33, 34]. However, upon BAPTA-AM+ABT-737-induced apoptosis, ERK phosphorylation returned back to the basal level (data not shown). This result shows that up-regulation of ERK phosphorylation is not required when apoptosis occur and that p-ERK does not seem to have a pro-apoptotic action in our models. This is in agreement with the conclusions we already obtained with BEZ-235 [10] and miR-491-5p [35]. Actually, in these studies p-ERK was shown to prevent apoptotic processes due to its capacity to phosphorylate the pro-apoptotic BH3-only Bim leading to its proteasomal degradation.

One hypothesis that could explain the differential regulation of mTOR and AKT is that mTOR regulation could partially be independent of AKT's one. Conus et al. have shown that calcium regulates differently AKT and p70S6K in Balb/c-3T3 fibroblasts. Actually, they demonstrated that these two kinases are likely to lie on separated pathways with the activation of p70S6K requiring a separate calcium-dependent process [36]. These results were also observed in rat-1 fibroblasts where mTOR and its downstream targets activation were achieved either by PDGF via a classical calcium insensitive PI3K/AKT pathway or by a calcium sensitive phospholipase D/phosphatidic acid pathway [20]. We thus tested if inhibiting PLD could lead to Mcl-1 inhibition. Actually no Mcl-1 expression modification was detected with FIPI in the conditions tested. These treatments modified neither AKT activation nor mTOR, p70S6K and 4E-BP1 phosphorylation (Supp data 3) suggesting that calcium/PLD/mTOR pathway does not seem to be involved in Mcl-1 regulation.

We also tested the potential involvement of Protein Kinase C (PKC) in Mcl-1 down regulation. PKC has been discovered as a calcium and phospholipid dependent serine/threonine-specific protein kinase. The classical PKC isoforms (cPKCs) require calcium for optimal activity. These proteins are involved in several cellular processes, such as cell proliferation, differentiation, and survival, and they are also important for the establishment and progression of malignant disorders such as cancer [37]. At last, Bryostatin (a macrocyclic lactone) or activation of sphingosine-1-phosphate receptor were described to induce Mcl-1 expression through PKC activation [37, 38]. To assess the possible involvement of PKC in calcium-mediated Mcl-1 regulation, we treated ovarian carcinoma cells with a specific PKC inhibitor, GF109203X. A dose response and a time course treatments were performed in both cell lines but no modulation of Mcl-1 expression was observed whatever the dose and the time considered suggesting that calcium-regulated Mcl-1 expression does not require PKC activation (data not shown).

We next tested whether calmodulin antagonists as W7 could down-regulate Mcl-1. Calmodulin is one of the major calcium sensor in the cell and plays central role in cell motility, proliferation and apoptosis [21]. Calmodulin is described to interact directly with numerous proteins as mTOR [39] or AKT [40]. The results obtained showed that W7 decreases Mcl-1 expression and mTOR targets activation in both cell lines. mTOR regulation by calmodulin was often described and molecular mechanisms were elegantly deciphered by Gulati [39]. In this study, authors demonstrated that amino acids triggered a rise of  $[Ca^{2+}]_i$  from extracellular stores that bound calmodulin. Thereafter, this complex bound a class III PI3K (human vacuolar protein sorting 34, called hVps34) through its conserved calmodulin-binding motif which triggered mTOR complex activation. It is noteworthy that, like in our study, BAPTA-AM was able to inhibit p70S6K and 4E-BP1 phosphorylations but had no effect on AKT (ser473). It could be hypothesized that similar events occur in ovarian carcinoma cells. As enforced Mcl-1 expression protects from W7 + ABT-737 or BAPTA-AM+ABT-737 apoptosis, this anti-apoptotic protein could be considered as one of the calcium and calmodulin target.

The comparison of W7 effect in the 2 ovarian cell lines tested revealed that W7 differently regulate AKT phosphorylation. Actually, whereas W7 does not modify AKT activation in SKOV3 cells, it strongly decreased phospho-AKT expression in IGROV1-R10 cells. Similar results were also obtained by Coticchia et al., in breast carcinoma cells [41]. In this study, authors found that EGF-induced AKT activation was dependent on calmodulin in the majority of human breast cancer cell lines. However, in some cases this effect did not occur. In their study, this discrepancy partially depends on the basal level of activated AKT because enforced expression of AKT reduced the effect of W7 expression. This does not seem to be the case in our study because basal level of AKT (Thr308) and (Ser473) are higher in IGROV1-R10 cell lines than in SKOV3 (cf [10]). They also found that forced overexpression of EGFR and ErbB2 partially restores calmodulin-dependent AKT signaling suggesting that EGFR status could explain this discrepancy. However, both ovarian carcinoma cell lines express similar EGFR basal level (data not shown). These hypotheses could not then explain the difference of sensitivity in the cell lines tested and further researches are required to decipher the molecular events involved. However it is important to note that whatever was the sensitivity of AKT to W7 in breast cancer cell lines tested, BAPTA-AM treatment was never able to inhibit AKT activation [41].

A plausible hypothesis that explains why AKT is sensitive to calmodulin and not BAPTA-AM is that its activation could be mediated via the action of a calcium-

independent calmodulin (apo-calmodulin) in IGROV1-R10. Actually, apo-calmodulin is a protein that differs from calcium-bound calmodulin in its tertiary structure, and like calcium-bound form, is known to be involved in functions vital to cellular life. These results are not however in agreement with Deb TB and coworkers study where BAPTA-AM and W7 both inhibit EGF-induced AKT (ser473) phosphorylation, suggesting that in MYC83 cells, unlike IGROV1-R10 cells, AKT activation is mediated via a calcium-dependent calmodulin. This discrepancy highlights that calcium-mediated AKT regulation is specific to each cell type tested.

$Ca^{2+}$ /calmodulin complex is known to activate many cellular effectors including Calcium/calmodulin-dependent kinase II (CamKII), calmodulin kinase kinases (CamKK) or AKT [21]. To find molecular intermediate between  $Ca^{2+}$ /calmodulin complex and Mcl-1, we first evaluated if CamKII could be involved in Mcl-1 expression. Actually, this kinase was involved in Mcl-1 regulation in a model of prostate carcinoma cells [17]. Results presented in Supp data 4 revealed that KN93 has a modest effect on Mcl-1 and has a modest effect on AKT phosphorylation leading to the conclusion that a calcium/calmodulin/CAMKII pathway does not seem to be involved in Mcl-1 regulation in the conditions tested. This is not in agreement with Ma S. study where CamKIIN $\beta$ , an endogenous inhibitor of CamKII was found to down-regulate AKT (Ser 473) expression in HO-8910PM ovarian cancer cells. A hypothesis that could explain this discrepancy is that we treated our cells only for 6 h and it could not be ruled out that KN93 decreases AKT phosphorylation for longer time of treatment (24, 48 and 72 h) as presented by Ma S. and coworkers with CamKIIN $\beta$ . Moreover CamKIIN $\beta$  is possibly more specific to CamKII than KN93 is, explaining AKT(ser473) stronger inhibition.

Finally, CAMKK inhibition with STO-609 did not down-regulate Mcl-1 expression suggesting that these kinases were not implicated in calcium/calmodulin-mediated Mcl-1 up-regulation (data not shown).

We previously demonstrated that ovarian carcinoma cells are addicted to Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 anti-apoptotic members and that these two proteins cooperate to compromise chemosensitivity. Actually silencing these proteins with siRNA is sufficient to eradicate ovarian carcinoma cells without the requirement of chemotherapy [5, 8]. Targeting Mcl-1 is all the more crucial that ABT-737 (a powerful Bcl-x<sub>L</sub> inhibitor which is a potential candidate for clinic use) is not only unable to target this protein but also increases Mcl-1 expression inducing by this way its own chemoresistance. Actually, calcium has a strong impact on cellular fate and calcium signaling is often deregulated during carcinogenesis. Moreover, calcium pathway has already been described to regulate Mcl-1 in other types of

cancer [16, 17] and this study suggests that Mcl-1 is also regulated by calcium signaling in ovarian carcinoma cells. To comfort these findings overexpression of 4E-BP1 target: eIF4E (eukaryotic translation Initiator Factor 4E) increased Mcl-1 expression and rescued ovarian carcinoma cells from calcium signaling inhibitors + ABT-737-induced apoptosis suggesting that Mcl-1 is crucial for ovarian carcinoma cell survival and that calcium signals act partially through mTORC1 pathway.

The universality of calcium signaling leads to think that targeting calcium would have major effects on all cell types and have not its place for molecular targeted therapy. Actually, a misconception is that calcium is often seen as a simple switch to trigger cellular responses. However, it appears that according to the cell line tested, modulating calcium does not have the same consequence on AKT/mTOR and ERK activation which supports that calcium signaling is specific to cancer cells type. What could explain these differences is that calcium signaling ensues from channels and pumps that specifically regulate cellular processes controlled by calcium and many of these calcium toolkits exhibit specific tissue distribution and their alteration are considered as cancer signatures [42, 43]. Actually, an elegant work from Dubois et al. [44] demonstrated that prostate cancer can undergo an oncogenic switch due to an increase in ORAI3 expression. This alteration modified the nature of the calcium channel from a store-operated calcium channel (constituted of ORAI1 subunits) to an arachidonic acid-regulated one (ARC channel—constituted of ORAI1/3 subunits) leading to increased proliferation and apoptotic resistance promotion [44]. In a similar way, the nature of TRP calcium channels expression is correlated to clinical parameters in breast cancer. Indeed, the expression of TRPM8 is significantly associated with low histological grade tumors and could be considered as a good prognostic marker; by contrast, TRPV6 overexpression is correlated with high-grade tumors and is regarded as a marker of poor prognosis [42, 45]. Concerning ovarian carcinoma cells, TRPV6, TRPC3 and T-type calcium channel are found to be overexpressed leading to think that these proteins could be considered as therapeutic targets [13, 46, 47]. It is thus possible that according to the calcium toolkits expressed in cancer cells types, calcium signals could differs in amplitude and frequency leading to activation of specific calcium effectors and specific cellular responses.

One interesting thing described by Dziegielewska and coworkers is that calcium channels inhibitors could be therapeutically beneficial when combined with standard cytotoxic chemo- or radiotherapy. Thus already commercialized calcium inhibitors could be diverted to be used in chemotherapy. In this regard, clinical trial combining Mibefradil Dihydrochloride (a known antihypertensive

drug) and Temozolomide has been approved for treating patients with recurrent glioma (NCT01480050) [48].

Taken together, we found that calcium signaling regulates Mcl-1 through translational events and a calmodulin-mediated pathway. BAPTA-AM and calmodulin inhibitor combination with ABT-737 leads to apoptosis, a process that is reversed by Mcl-1 enforced expression. As Mcl-1 represents a crucial hurdle to the success of chemotherapy, these results could open to new area of investigation using calcium modulators to directly or indirectly target Mcl-1 and thus efficiently sensitize ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

**Acknowledgments** We acknowledge Marilyne Guillamin (Flow cytometry core facility, SF 4206 ICORE, University of Caen) for her helpful technical support. Acquisition of the xCELLigence real-time activity measurement system has been supported by European Community (FEDER) and the Comprehensive Cancer Center F. Baclesse.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

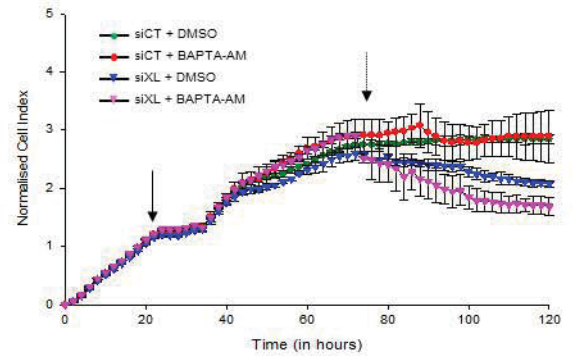
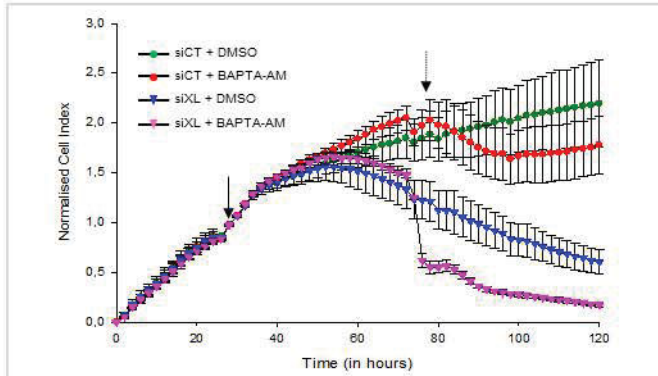
## References

1. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
2. Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M (2013) Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 13:455–465
3. Shigemasa K, Katoh O, Shiroyama Y et al (2002) Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 93:542–550
4. Villedieu M, Louis MH, Dutoit S et al (2007) Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 105:31–44
5. Brotin E, Meryet-Figuere M, Simonin K et al (2010) Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int.J. Cancer* 126:885–895
6. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR et al (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435:677–681
7. van Delft MF, Wei AH, Mason KD et al (2006) The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10:389–399
8. Simonin K, N'diaye M, Lheureux S et al (2013) Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis* 18:492–508
9. Konopleva M, Milella M, Ruvolo P et al (2012) MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia* 26:778–787

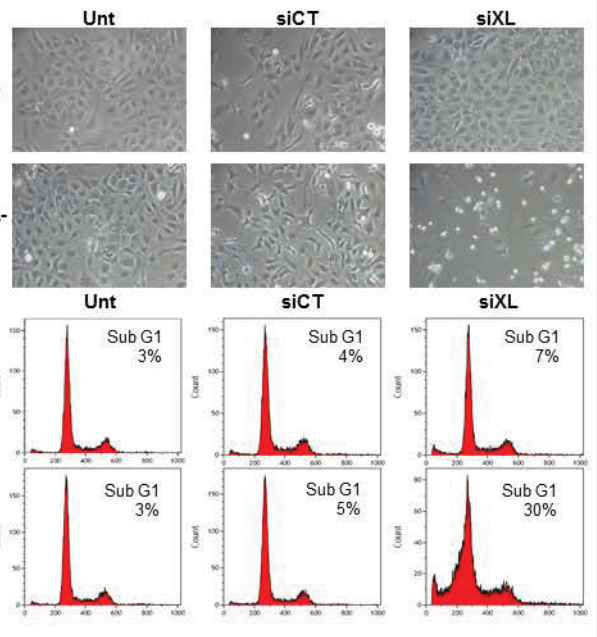
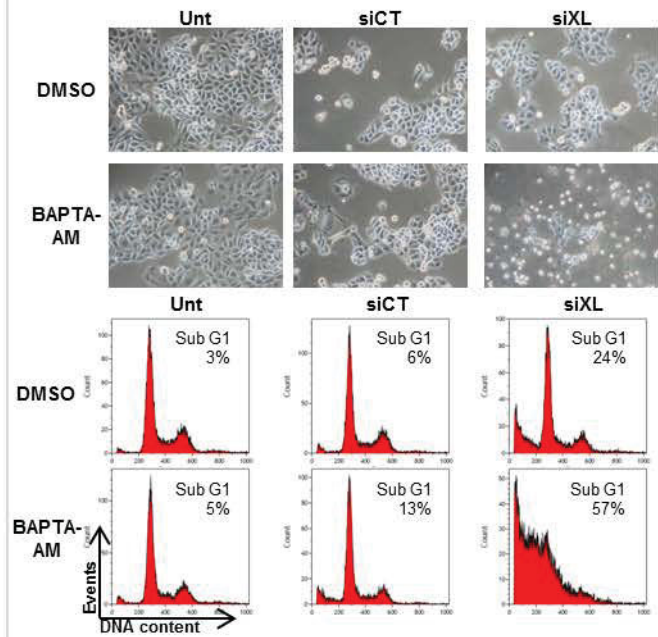
10. Jebahi A, Villedieu M, Petigny C et al (2014) PI3 K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-x-targeting strategies, provided that Bim expression is induced. *Cancer Lett*
11. Carracedo A, Baselga J (2008) Pandolfi PP. Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors. *Cell Cycle* 7:3805–3809
12. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2013) Targeting Ca(2+)-transport in cancer: close reality or long perspective? *Expert Opin Ther Targets* 17:225–241
13. Yang SL, Cao Q, Zhou KC, Feng YJ, Wang YZ (2009) Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28:1320–1328
14. Wilson BE, Mochon E, Boxer LM (1996) Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 16:5546–5556
15. Davis FM, Azimi I, Faville RA et al (2013) Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*
16. Jiang CC, Lucas K, Avery-Kiejda KA et al (2008) Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res* 68:6708–6717
17. Rokhlin OW, Guseva NV, Taghiyev AF, Glover RA, Cohen MB (2010) KN-93 inhibits androgen receptor activity and induces cell death irrespective of p53 and Akt status in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 9:224–235
18. Thomas LW, Lam C, Edwards SW (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584:2981–2989
19. Mills JR, Hippo Y, Robert F et al (2008) mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10853–10858
20. Ballou LM, Jiang YP, Du G, Frohman MA, Lin RZ (2003) Ca(2+)- and phospholipase D-dependent and -independent pathways activate mTOR signaling. *FEBS Lett* 550:51–56
21. Berchtold MW, Villalobo A (2014) The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1843:398–435
22. Hsieh AC, Costa M, Zollo O et al (2010) Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 17:249–261
23. Preuss E, Hugle M, Reimann R, Schlecht M, Fulda S (2013) Pan-mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor AZD8055 primes rhabdomyosarcoma cells for ABT-737-induced apoptosis by down-regulating Mcl-1 protein. *J Biol Chem* 288:35287–35296
24. Lucas KM, Mohana-Kumaran N, Lau D et al (2012) Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737. *Clin Cancer Res* 18:783–795
25. Hahnel PS, Thaler S, Antunes E, Huber C, Theobald M, Schuler M (2008) Targeting AKT signaling sensitizes cancer to cellular immunotherapy. *Cancer Res* 68:3899–3906
26. Ma S, Yang Y, Wang C et al (2009) Endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis through down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/HDM2 pathway. *J Biol Chem* 284:24773–24782
27. Deb TB, Coticchia CM, Dickson RB (2004) Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:38903–38911
28. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C et al (2009) Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3 K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* 8:742–753
29. Feldman ME, Apse B, Uotila A et al (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7:e38
30. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J et al (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3 K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118:3065–3074
31. Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293
32. Fruman DA, Rommel C (2014) PI3 K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 13:140–156
33. Kohno M, Pouyssegur J (2006) Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 38:200–211
34. Cagnol S, Chambard JC (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277:2–21
35. Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuere M et al (2014) miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis* 5:e1445
36. Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB (1998) Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J Biol Chem* 273:4776–4782
37. Thomas A, Pepper C, Hoy T, Bentley P (2004) Bryostatins induce protein kinase C modulation, Mcl-1 up-regulation and phosphorylation of Bcl-2 resulting in cellular differentiation and resistance to drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 45:997–1008
38. Rutherford C, Childs S, Ohotski J et al (2013) Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1. *Cell Death Dis* 4:e927
39. Gulati P, Gaspers LD, Dann SG et al (2008) Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca2+/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* 7:456–465
40. Dong B, Valencia CA, Liu R (2007) Ca(2+)/calmodulin directly interacts with the pleckstrin homology domain of AKT1. *J Biol Chem* 282:25131–25140
41. Coticchia CM, Revankar CM, Deb TB, Dickson RB, Johnson MD (2009) Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 115:545–560
42. Ouadid-Ahidouch H, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Sevestre H, Ahidouch A (2013) TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends Mol Med* 19:117–124
43. Stewart TA, Yapa KT, Monteith GR (2014) Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*
44. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V et al (2014) Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell* 26:19–32
45. Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, 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
46. Lehen'kyi V, Raphael M, Prevarskaya N (2012) The role of the TRPV6 channel in cancer. *J Physiol* 590:1369–1376
47. Li W, Zhang SL, Wang N, Zhang BB, Li M (2011) Blockade of T-type Ca(2+) channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest* 29:339–346
48. Dziegielewska B, Gray LS, Dziegielewska J (2014) T-type calcium channels blockers as new tools in cancer therapies. *Pflug Arch* 466:801–810

**IGROV1-R10**

**SKOV3**

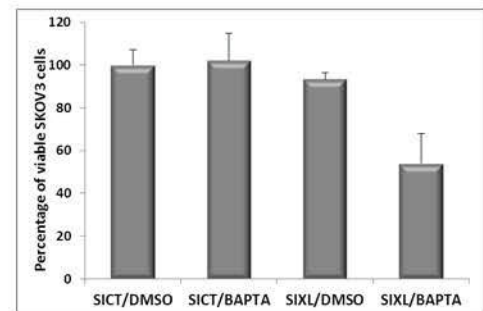
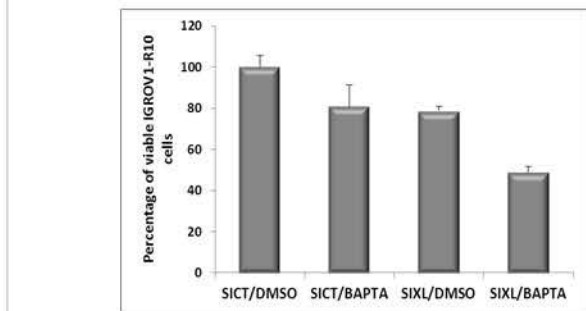


**A**

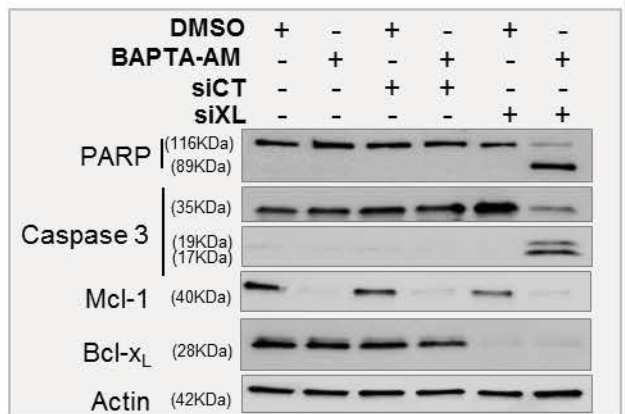
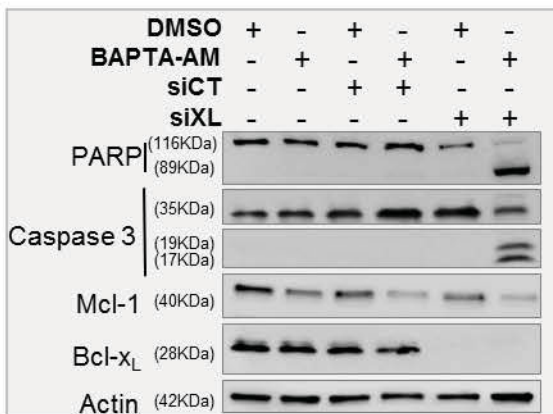


**B**

**C**

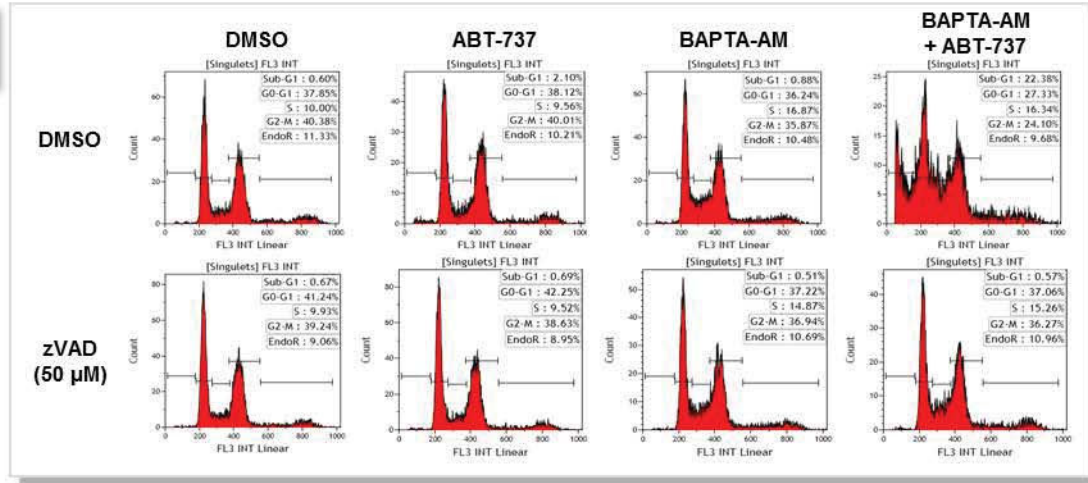


**D**

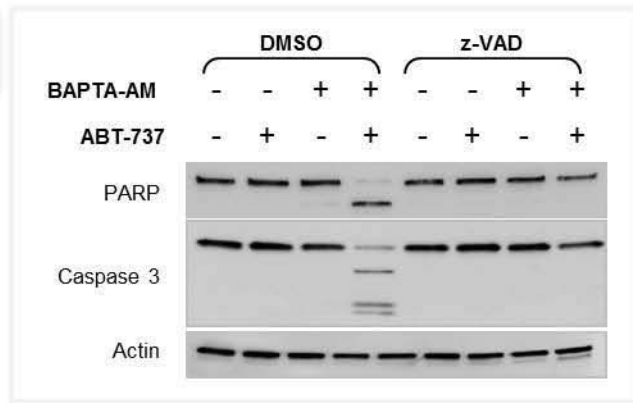


**E**

**A**



**B**



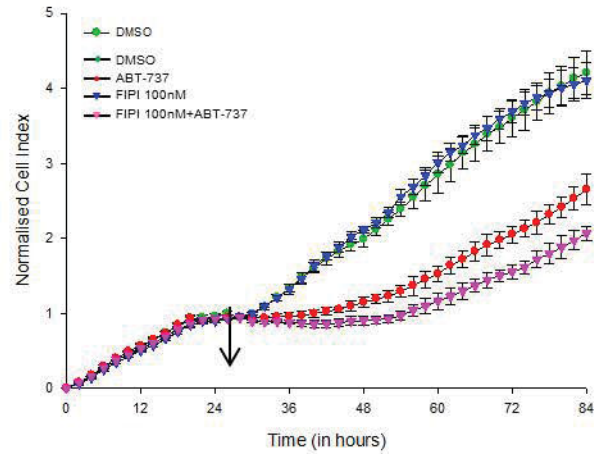
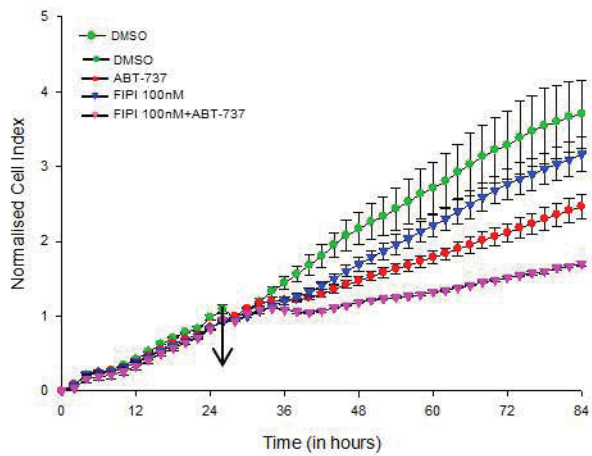
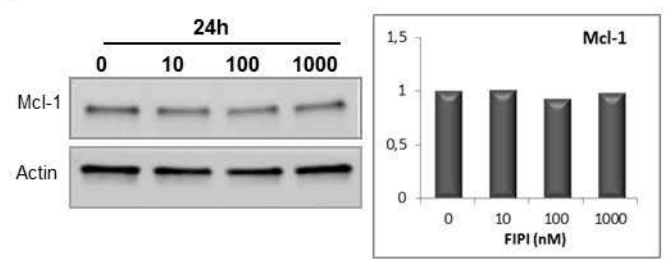
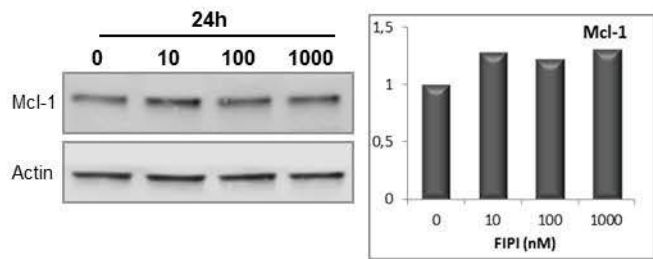
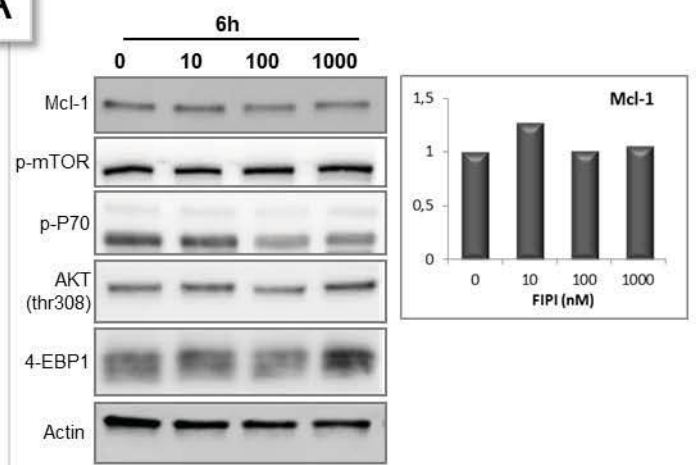
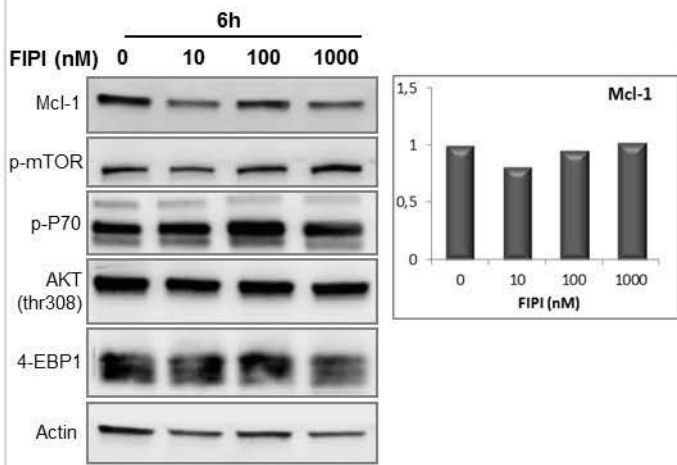
**IGROV1-R10**

**SKOV3**

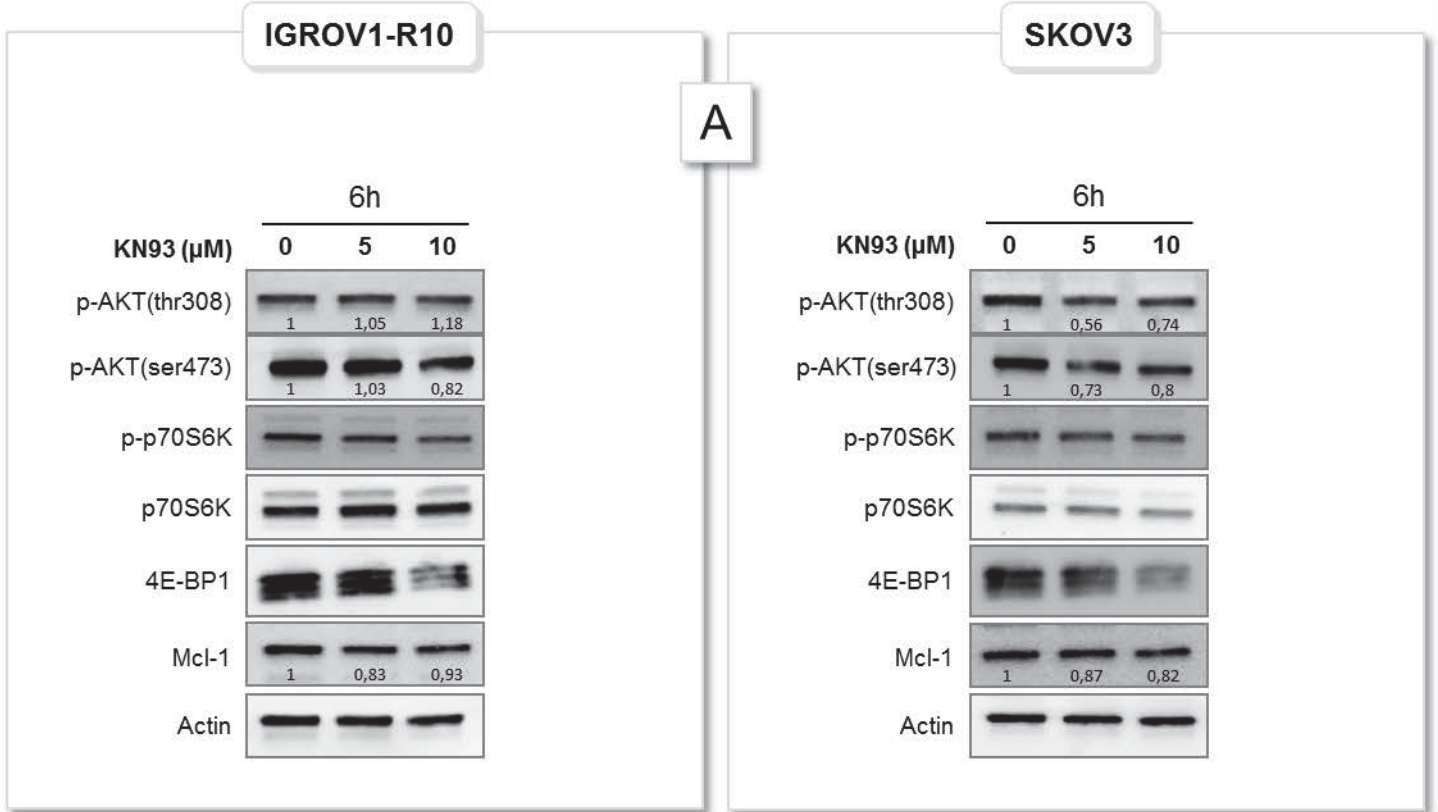
**A**

**B**

**C**







Supplementary data 1: Calcium chelation combined with siRNA targeting Bcl-x<sub>L</sub> leads to apoptosis in ovarian carcinoma. **(A)** Real time analysis of cellular cytotoxicity of siXL/BAPTA-AM combination. Histogram was obtained using the xCELLigence System as described in *Material and Methods*. Cells were grown for 24h and then transfected with an ineffective siRNA (siCT) or siXL (arrow). Twenty-four hours after transfection, cells were treated or not (DMSO) with 10 μM BAPTA-AM (dotted arrow). Cell Index was recorded every 2 hours. The results are the means of three replicates, with displayed standard error bars. IGROV1-R10 and SKOV3 cells were transfected or not (Unt) with either siCT or with siXL for 48 hours. After transfection, cells were exposed to 10μM BAPTA-AM or DMSO for 6h. **(B)** Morphological features and **(C)** DNA content were studied for each condition. **(D)** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. **(E)** PARP and caspase 3 cleavages, Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub> expressions were studied by western-blot. Data are representative of three independent experiments.

Supplementary data 2: Caspases inhibition prevents BAPTA-AM/ABT-737 combination-induced apoptosis. SKOV3 cells were pre-treated 1h30 with the pan caspase inhibitor z-VAD (50μM) then cotreated with either DMSO or 10μM ABT-737 for 6 hours. **(A)** DNA contents were analysed for each conditions by flow cytometry. **(B)** Cleavages of PARP and Caspase 3 were assessed by western blot.

Supplementary data 3: PLD inhibition does not down-regulate Mcl-1 expression. IGROV1-R10 and SKOV3 were treated for 6h with FIPI, a pharmacological PLD inhibitor. **(A)** Mcl-1, p-mTOR, 4E-BP1, p-P70s6K, and p-AKT(thr308) expressions were assessed by western blot and Mcl-1 expression was quantified by densitometry. **(B)** IGROV1-R10 and SKOV3 were treated for 24h and Mcl-1 expression was assessed by western blot and quantified by densitometry. **(C)** Real time analysis of cellular cytotoxicity of FIPI/ABT-737 combination. Histogram was obtained using the xCELLigence System as described in *Material and Methods*. Cells were grown for 24h and then treated with 100nM FIPI and 10 $\mu$ M ABT-737 (arrow). Cell Index was recorded every 2 hours. The results are the means of three replicates, with displayed standard error bars.

Supplementary data 4: CamKII inhibition does not down-regulate Mcl-1 expression in ovarian carcinoma cells. IGROV1-R10 and SKOV3 were treated for 6h with increasing concentration of KN93, a pharmacological CamKII inhibitor. AKT, p70s6K, 4E-BP1 phosphorylations and Mcl-1 expression were assessed by western blot and proteins expressions were quantified by Image J software. Data are representative of three independent experiments.

## Conclusions :

Cette étude montre tout d'abord que l'inhibition du calcium par le BAPTA-AM a un effet cytostatique sur les lignées IGROV1-R10 et SKOV3 et induit une diminution rapide et transitoire de l'expression de Mcl-1. Cette inhibition n'est pas transcriptionnelle, ni post-traductionnelle mais traductionnelle et implique l'inhibition de mTORC1 et de ses cibles P70S6K et 4EBP1. Par la suite, la combinaison du BAPTA-AM avec l'ABT-737 ou avec un siRNA anti-Bcl-x<sub>L</sub> a permis d'induction l'apoptose dans nos cellules.

Nous avons ensuite voulu mettre en évidence la façon dont laquelle l'inhibition du calcium induit l'inhibition de Mcl-1 et avons observé l'implication de la calmoduline, senseur du calcium dans la cellule. L'inhibition de la CaM induit alors l'inhibition de Mcl-1 et sensibilise les cellules à l'apoptose en combinaison avec l'ABT-737. Cependant, dans nos conditions l'inhibition de la CamKII ou de la CamKK en aval de la CaM n'ont pas eu d'impact sur l'expression de Mcl-1.

L'implication d'autres molécules impliquées dans la signalisation calcique a été également écartée. En effet, ni l'inhibition de la PLC, ni l'inhibition de la PKC n'ont permis d'inhiber Mcl-1 dans nos cellules.

Enfin, nous avons confirmé que l'inhibition de Mcl-1 par les inhibiteurs calciques joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose, en combinant le BAPTA-AM ou le W7 avec l'ABT-737 dans des cellules surexprimant ou non Mcl-1, et nous avons montré que cette surexpression protège les cellules contre l'apoptose. De plus, nous avons prouvé que l'inhibition de Mcl-1 par le BAPTA-AM ou le W7 était bien due à l'inhibition de mTORC1 en surexprimant le facteur de traduction eIF4E, cible de 4EBP1. Cette surexpression protège alors partiellement les cellules contre l'apoptose induite par les combinaisons BAPTA-AM+ABT-737 et W7+ABT-737.

Cette étude a permis de mettre en évidence la pertinence d'utiliser des molécules inhibitrices du calcium pour inhiber Mcl-1 et de les combiner avec des stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> pour restaurer leur capacité à entrer en apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes.

# Publication n°2 :L'inhibition des canaux calciques capacitifs par le carboxyamidotriazole sensibilise les cellules ovariennes chimiorésistantes aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> en inhibant de Mcl-1

## Introduction

Une première publication a permis de démontrer que la chélation calcique par le BAPTA-AM permettait d'inhiber Mcl-1 via la voie mTORC1 et de sensibiliser les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub>. Cependant, l'utilisation d'un chélateur calcique n'est pas envisageable en clinique. Nous nous sommes alors intéressés aux molécules inhibitrices des flux calciques disponibles en thérapeutique et nous nous sommes tournés vers l'utilisation du CAI. Cette molécule, inhibitrice notamment des IP3R et de l'entrée de calcium capacitive, était particulièrement attrayante puisqu'elle était déjà connue pour ses effets anti-prolifératifs, anti-invasifs et anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* et qu'elle a fait l'objet d'essais cliniques notamment dans les cancers de l'ovaire. (Alessandro et al., 1998) (Felder et al., 1991) (Kohn and Liotta, 1990) (Kohn et al., 1992) (Moody et al., 2003) (Hussain et al., 2003) (Rodland et al., 1997) (Kohn and Liotta, 1995).

Le but de cette étude était de mettre en évidence que l'utilisation du CAI permettait, tout comme la chélation calcique par le BAPTA-AM, d'inhiber Mcl-1 *via* la voie mTORC1 et, le cas échéant, de montrer que sa combinaison avec l'ABT-737, autre molécule en essais cliniques notamment dans les cancers de l'ovaire (essai MONAVI-1), induisait l'apoptose au sein de nos lignées cancéreuses ovariennes chimiorésistantes.

**Store-operated channels pathway inhibition by carboxyamidotriazole  
sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl<sub>x</sub>L strategies  
through Mcl-1 down-regulation**

Marie-Laure Bonnefond<sup>1,2</sup>, Romane Florent<sup>1,2</sup>, Sophie Lenoir<sup>3</sup>, Nicolas Elie<sup>1,4</sup>,  
Bernard Lambert<sup>1,2,5</sup>, Edwige Abeillard<sup>1,2</sup>, Florence Giffard<sup>1,2</sup>, Marie-Hélène Louis<sup>1,2</sup>, Mélanie Briand<sup>1,2,6</sup>,  
Denis Vivien<sup>3</sup>, Laurent Poulain<sup>1,2</sup>, Pascal Gauduchon<sup>1,2</sup>, Monique N'Diaye<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1086 ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for Cancers Prevention and Treatment, BioTICLA axis (Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancers), Caen, France

<sup>2</sup>UNICANCER, Comprehensive Cancer Center François Baclesse, BioTICLA lab, Caen, France

<sup>3</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S 1237 - Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques (PhIND), tPA and Neurovascular Disorders team, Caen, France

<sup>4</sup>Normandie Univ, UNICAEN, Centre de Microscopie Appliqué à la Biologie (CMabio, Structure Fédérative 4206 ICORE)

<sup>5</sup>CNRS

<sup>6</sup>Centre de Ressources Biologiques « OvaRessources », François Baclesse Comprehensive Cancer Centre, Caen, France

\*Corresponding Author: Dr Monique N'Diaye; e-mail: [monique.ndiaye@unicaen.fr](mailto:monique.ndiaye@unicaen.fr)

**Corresponding author address:**

INSERM U1086 ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for Cancers Prevention and Treatment  
BioTICLA axis (Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancers)  
Comprehensive Cancer Center François Baclesse, BP5026  
14076 Caen cedex 05  
France

**Abbreviations:** 4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein;  $[Ca^{2+}]_i$ : intracytosolic calcium concentration; CAI: Carboxyamidotriazole; CaM: Calmodulin; IP3R: Inositol Trisphosphate Receptor; mTORC1/2: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 / 2; p70S6K: p70 S6 kinase; PARP: Poly(ADP-ribosyl) polymerase; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; STIM: stromal interaction molecule, ORAI: calcium release-activated calcium modulator; SERCA: sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase; SOCE: Store-Operated Calcium Entry; TRP: Transient Receptor Potential

**Key words:** ovarian cancer, SOCE, mTORC1, Mcl-1, ABT-737, apoptosis

## **Abstract**

The anti-apoptotic proteins Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 have been identified to play a pivotal role in apoptosis resistance in ovarian cancer and constitute key targets for innovative therapeutic strategies. Although BH3-mimetics (e.i. ABT-737) potently inhibit Bcl-x<sub>L</sub> activity, targeting Mcl-1 remains a hurdle to the success of these strategies. Calcium signaling is profoundly remodeled during carcinogenesis and was described to activate the signaling pathway controlling Mcl-1 expression. In this context, we investigated the effect of carboxyamidotriazole (CAI), a calcium channel inhibitor used clinical trials, on Mcl-1 expression. This study highlighted that CAI had an anti-proliferative effect on ovarian carcinoma cell lines and strongly down-regulated Mcl-1 expression. This compound was shown to inhibited Store-Operated Calcium Entry and Mcl-1 translation through mTORC1 deactivation. Moreover, it sensitized ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies as their combination elicited massive apoptosis. Its effect on mTORC1 and Mcl-1 was mimicked by the potent SOCE inhibitor, YM58483, which also triggered apoptosis when combined to ABT-737. Altogether, this study suggests that CAI *via* its action on Mcl-1 translation sensitize to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies and that modulating SOCE could extent the therapeutic arsenal for ovarian carcinomas treatment.

## 1. Introduction

In spite of a low incidence in the population, epithelial ovarian carcinoma (EOC) is the fifth-leading cause of cancer-related deaths in women. It is estimated that in 2017, there will be more than 22240 new cases of ovarian cancers and 14080 deaths in the United States [1]. The standard treatment consists of a surgical resection of the tumor mass as complete as possible and a platinum-based chemotherapy in combination with paclitaxel [2]. Despite a good response to the first line chemotherapy, 80% of patients will relapse during the first 18 months due to chemoresistance. Escape from apoptosis is one of the major hallmarks of cancer cells and is frequently due to alteration of the ratio of [anti- versus pro-apoptotic] members of the Bcl-2 family that leads to an increase in apoptotic threshold during oncogenic stress [3]. This altered ratio could be considered as a therapeutic opportunity and it is widely accepted that targeting anti-apoptotic members is a relevant strategy to induce apoptosis in many types of cancer [4]. Our group previously showed that the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub> were able to cooperate to allow ovarian carcinoma cells to overcome apoptosis as their concomitant inhibition is sufficient to induce cell death [5-7]. These proteins are now considered as relevant targets for the treatment of chemoresistant ovarian cancers and the identification of adequate strategies for their efficient inhibition constitutes an exciting challenge.

The crucial role of Bcl-x<sub>L</sub> in cancers has favored the development of many tools to counteract its anti-apoptotic effect such as BH3-mimetics. These molecules that mimic the BH3 domain of pro-apoptotic proteins are able to hinder the function of anti-apoptotic proteins by binding their hydrophobic groove. Among these molecules, ABT-263 (Navitoclax), the orally administrable derivative of ABT-737, is currently undergoing Phase I and II clinical trials in different locations including ovarian cancer (NCT02591095). However ABT-737 does not target Mcl-1 and overexpression of this protein constitutes a hurdle to ABT-737-induced apoptosis [6].

Several strategies have been tested to inhibit Mcl-1 expression or activity. Among these, the benefit of PI3K/Akt/mTOR inhibitors to control Mcl-1 expression was investigated. Actually, targeting this survival pathway constitutes a key target for gynecological cancer therapy as it is overactivated in almost half of high-grade serous ovarian tumors. Moreover, mTORC1 is known to control Mcl-1 translation through 4-EBP1 phosphorylation [8-13]. In this context, the rational of combining PI3K/Akt/mTOR inhibitor with ABT-737 appeared strongly efficient to induce apoptosis in various cancer types including ovarian cancers *in vitro* and *in vivo* PDX models [14-17].

Among the different possibilities to impede PI3K/Akt/mTOR activation, the role of calcium has emerged for several years and appeared to be particularly attractive. Calcium is the most important second messenger in the cell and it regulates fundamental physiological events as gene expression, survival but also cell death. Its impact on the cell destiny relies on its finely regulation of the amplitude and/or the frequency of its signal [18-21]. As cancer cells require intense metabolism for their growth and motility, carcinogenesis often comes along with the modulation of calcium homeostasis (via modulation of calcium channels and pumps) for supplying cancer cells needs and activating pro-survival pathways [21-23]. In this context, several studies have highlighted that mTORC1 was a target for calcium [24-31]. Recently, we showed that calcium chelation by



BAPTA-AM and calmodulin inhibition by W7 led to Mcl-1 decrease *via* mTORC1/4E-BP1 pathway down-regulation and sensitized ovarian cancer cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies [13].

Modulating calcium signaling is now viewed as an emerging anti-tumoral strategy but only few calcium inhibitors have already been included in clinical trials [20;21]. One of the evaluated compounds, carboxyamidotriazole (CAI) was shown to have anti-tumoral and anti-angiogenic properties *in vitro* and *in vivo* through its ability to inhibit calcium channels [32-40]. This molecule has reached several phase II clinical trials and has shown encouraging results for ovarian carcinoma as it was described to stabilize for more than 6 months 31 % of patients with relapsed ovarian cancer [41]. As we previously showed that Mcl-1 was a target for calcium signaling pathway, we wanted to assess if CAI could modulate the expression of this anti-apoptotic protein, to decipher the underpinned molecular mechanisms, and if CAI could sensitize platinum-refractory ovarian cancer cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

## 2. Material and methods

### 2.1 Cell culture

The human platinum-resistant ovarian carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3, and SKOV3 were used. IGROV1-R10 was established as described previously (34) from the IGROV1 cell line, kindly provided by Dr. Jean Bénard (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). OVCAR3 and SKOV3 were obtained from the ATCC. The cell lines were authenticated in April 2016 by Microsynth who compared their STR profiles with the ATCC database. They were grown in RPMI1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM Glutamax<sup>TM</sup>, 25 mM HEPES, 10% FBS (Gibco) and 33 mM sodium bicarbonate and were maintained in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C.

### 2.2 Reagents:

CAI, YM58493, thapsigargin were provided by Tocris (R&D Systems). ABT-737 was supplied by Selleckem and Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) was supplied by Millennium Pharmaceuticals. Fura-2AM was purchased from Thermo Fisher Scientific. These compounds were commonly stored as stock solutions in DMSO at -20°C.

### 2.3 Proliferation analysis:

Cell number and viability were estimated by a semi-automated image-based cell analyzer (Cedex XS Analyzer, Roche Applied Science, Meylan, France) using the Trypan blue exclusion method.

### 2.4 Cell cycle analysis by flow cytometry:

Adherent and floating cells were pooled, washed with phosphate-buffered saline (PBS 1X) and fixed with ethanol 70%. Cells were then centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min and incubated for 30 min at 37°C in PBS 1X, to allow the release of low-molecular weight DNA. Cell pellets were stained with propidium iodide using the DNA Prep Coulter Reagent Kit (Beckman-Coulter). Samples were analyzed using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

### 2.5 Western-Immunoblotting:

Cells were rinsed with ice-cold PBS 1X and lysed in Lysis buffer (15 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% glycerol, 0.5% laurylmaltoside, 5 μM GDP, 1 μM microcystin (Enzo Life Sciences), 1 mM sodium orthovanadate and cOMplete Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich/Roche). After centrifugation, proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, CA). Thirty micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE (Biorad) and transferred to PVDF-membranes (Millipore). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: Bcl-2 (#M0887, DAKO), actin (MAB1501, Merk Millipore), Mcl-1 (#5453), Bcl-x<sub>L</sub> (#2764), PARP(#9542), caspase-3 (#9662), p-Akt (thr308; #13038), p-Akt (ser473; #4060), Akt (#9272), p-4E-BP1 (Thr70; #4370), 4E-BP1 (#9644), p-p70S6K (Thr389; #9205) and p70S6K (#9202), p-mTOR (Ser2448 ; #5536), p-mTOR (ser2481; #2974), p-CamKII (Thr286; #12716), p-AMPK (Ser485; #4184), AMPK (#2532) (Cell Signaling Technology). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare). Revelation was done using ECL

Prime Western Blot detection reagent (GE Healthcare). Western blots shown are from one experiment representative of at least three independent experiments and cell lysates. Signals were quantified by pixel densitometry using the ImageJ software.

#### *2.6 RNA extraction and real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR):*

Total RNA were isolated from ovarian carcinoma cell lines using Trizol (Invitrogen, Life Technologies). RNA quantity and quality were assessed using the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The first strand cDNA was synthesized using Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen) with random hexamers. cDNA (25 ng) were combined with 10 µmol/l of each forward and reverse primers, 50 µmol/l of the Taq-Man® probe and TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a 20 µl final reaction volume. Corresponding custom inventoried (ID: Hs00172036\_m1 for Mcl-1 and Hs99999905\_m1 for GAPDH) TaqMan® Gene Expression Assays were used (Applied Biosystems). All PCR amplification reactions were carried out in triplicate and detection was done on an Applied ABI Prism 7500 Fast PCR system (Applied Biosystems). GAPDH was used as a housekeeping reference gene for normalization.

#### *2.7 siRNA transfection:*

PAGE purified siRNAs were synthesized and annealed by the Eurogentec Company. Specific double-stranded 21 nt RNA oligonucleotides forming a 19 bp duplex core with 2 nt 3' overhangs were used to silence Bcl-x<sub>L</sub> (5' auuggugagucggaucgca-3', noted siXL). siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#1 (noted siCT) was purchased from Dharmacon. siRNA duplexes were transfected using the INTERFERin™ transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus-Transfection). Briefly, cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks to reach 30–50% of confluence at the time of transfection. The transfection reagent and the siRNAs were mixed and complex formation was allowed to proceed for 15 min at room temperature before to be applied to cells. After indicated time, cells were trypsinized and washed with ice-cold PBS 1X before analysis.

#### *2.8 Calcium imaging:*

Intracellular calcium concentration variations were analyzed by microspectrofluorometry using the Ca<sup>2+</sup>-sensitive probe Fura-2-AM as described previously [42]. Briefly, ovarian carcinoma cells were incubated at 37 °C in HBBSS buffer (116 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>; 12 mM HEPES; 0.34 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5.5 mM D-glucose; 10 µM Glycine; 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4) supplemented with 10 µM Fura-2-AM (#F1201 Thermofisher Scientific) for 45 min. Following probe loading, cells were treated or not by 5 µM CAI for 45 min. Then they were placed in a recording chamber mounted on the stage of an epifluorescence microscope (Lieca DMI 6000 B) inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40 ×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar, Germany). Fura-2AM-loaded cells were treated with 2 µM thapsigargin in HBBSS without CaCl<sub>2</sub> (0Ca<sup>2+</sup>) to trigger calcium efflux from the RE. In order to test SOCE, calcium was reintroduced in the medium by using classical HBBSS (+Ca<sup>2+</sup>). During the acquisition, cells were irradiated alternately with 340 and 380 nm light, and fluorescence from the trapped dye was measured at 510 nm. The ratio of fluorescence intensities recorded after excitation at 340 nm (F340) and at

380 nm (F380) was used to estimate intracellular calcium concentrations ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and was acquired every 5 seconds with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C). The monochromator and the photometers allow emission and detection of fluorescence from ~12 cells in the field of view. Data analysis was performed using MM Fluor software (Universal Imaging Corporation).

### *2.9 Statistical analysis*

The values were presented as means  $\pm$  S.E.M. for at least three independent experiments. Paired student's *t*-test was used for statistical analysis. Differences were considered statistically different if  $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*);  $p < 0.001$  (\*\*\*) .

### 3. Results:

#### *3.1 CAI inhibits Mcl-1 expression and has an anti-proliferative effect on ovarian carcinoma cells*

The expression of the Bcl-2 family anti-apoptotic members was analyzed in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cell lines treated with increasing concentrations of CAI from 24h to 72h. Whereas no variation in Mcl-1 expression was noticed in the three cell lines after 24h of treatment, a drastic decrease of this anti-apoptotic was observed from 48h of treatment in IGROV1-10 and from 72h of treatment in OVCAR3 and SKOV3 cells (Figure 1A). This decrease appeared from 2.5  $\mu\text{M}$  of CAI and was accentuated for 5  $\mu\text{M}$ . Regarding the other anti-apoptotic members, Bcl-x<sub>L</sub> expression was not modulated by CAI excepted for OVCAR3 and SKOV3 cells in which it was slightly induced after 72h of treatment (Figure 1A). Bcl-2 was not expressed in IGROV1-R10 cells as previously described [13] and was not significantly modulated upon CAI treatment for OVCAR3 and SKOV3 (Figure 1A).

To study the effect of CAI on IGROV1-R10, OVCAR3, and SKOV3 ovarian cancer cell lines proliferation, the three cell lines were treated with increasing concentrations of CAI for 24h, 48h and 72h. Results showed that from a concentration of 2,5  $\mu\text{M}$ , this calcium inhibitor exerted an anti-proliferative effect on the three cell lines. However, whereas this effect was observed for a 48h-treatment in IGROV1-R10 cells, it only appeared for a 72h-treatment in OVCAR3 and SKOV3 cells (Figure 1B). Treatment with CAI did not exert significant blockade in cell cycle phases and sub-G1 peak analysis revealed that for conditions leading to Mcl-1 inhibition (5 $\mu\text{M}$  / 48h for IGROV1-R10, 5 $\mu\text{M}$  / 72h for OVCAR3 and SKOV3), CAI did not induce apoptosis as confirmed by the absence of PARP and caspase 3 cleavages (Figure 1C and 1D). This supports that CAI-induced Mcl-1 inhibition is not a consequence of cell death or cleavage by caspase 3 protein as previously described [43]. Moreover, the absence of cell death could be ascribed to Bcl-x<sub>L</sub> maintenance in response to CAI.

#### *3.2 Store-mediated Ca<sup>2+</sup> entry is inhibited upon CAI treatment in ovarian carcinoma cell lines*

As CAI is known to inhibit various calcium channels, we tempted to identify the nature of the channels targeted by this compound in ovarian carcinoma models [32-37]. For this purpose, store-operated calcium entry (SOCE) was evaluated by using "Ca<sup>2+</sup> re-addition" methodology [44]. SOCE is an ubiquitous extracellular Ca<sup>2+</sup> entry pathway. Upon calcium RE depletion by IP3 receptor (IP3R) opening, the Ca<sup>2+</sup> sensor molecules STIM-1 (Stromal Interaction Molecule-1) aggregate on the RE surface and physically interact with ORAI 1 proteins (Calcium release-activated calcium channel protein 1) located on plasma membrane. This leads to the formation of a channel (Store-Operated Channel; SOC) that allows calcium influx from extracellular medium [45].

Cells were thus placed in a Ca<sup>2+</sup>-free HBBSS medium with 2  $\mu\text{M}$  thapsigargin, an inhibitor of sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA), in order to deplete calcium from endoplasmic reticulum. Upon this treatment, IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells exhibited a rapid rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> reflecting calcium release from RE *via* IP3 receptor [46]. Subsequent reintroduction of 2 mM CaCl<sub>2</sub> to the extracellular medium triggered a sustained increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> from baseline (x4.23 in IGROV1-R10, x2.66 in OVCAR3 and x7.28 in SKOV3), which is consistent with a characteristic SOCE-mediated Ca<sup>2+</sup> influx from the extracellular solution (Figure 2A and 2B). Experiment reiterated with cells pretreated 1 hour with 5  $\mu\text{M}$  CAI showed that whereas CAI did not inhibit

calcium release from IP3R, it potentially inhibited SOCE induced-calcium entry in all the cell lines tested (Fig. 2A and 2B). Altogether, this strongly suggests that CAI inhibits store-operated calcium channels in ovarian carcinoma cells.

### *3.3 CAI-induced Mcl-1 inhibition is not transcriptional or post-translational but is correlated with inhibition of mTORC1 pathway*

To decipher the mechanisms underlying Mcl-1 down-regulation in response to CAI, Mcl-1 mRNA expression was quantified using RT-qPCR. Treatment of cells with 5  $\mu$ M CAI for 48h (IGROV1-R10) or 72h (OVCAR3 and SKOV3) did not inhibit Mcl-1 expression at mRNA level (Figure 3A), suggesting that CAI induced Mcl-1 down-regulation through transcription-independent mechanisms.

In order to evaluate if Mcl-1 decrease upon CAI treatment was a consequence of proteasomal degradation, we incubated ovarian carcinoma cells with CAI for 48h (IGROV1-R10) or 72h (OVCAR3 and SKOV3) but supplemented the medium with bortezomib, a proteasome inhibitor, for the last 24 hours before analysis. As depicted in Figure 3B, bortezomib prevented Mcl-1 degradation in the three cell lines tested but did not prevent the loss of Mcl-1 induced by CAI. This result allowed us to postulate that translational events were involved in Mcl-1 inhibition.

In this line, we assessed the impact of CAI on the Akt/mTOR pathway known to control Mcl-1 translation. Treatment with CAI dose-dependently inhibited mTORC1 activation in the three cell lines, as reflected by p-mTOR(ser2448), p-4E-BP1 and p-p70S6K decrease (Figure 3C). According with previous reports, mTORC1(ser 2448) inhibition led to a feedback loop that triggered a transient up-regulation of p-Akt(thr308) and p-Akt(ser473) in OVCAR3 and SKOV3. Regarding IGROV1-R10, although p-Akt(thr308) was also found up-regulated, CAI treatment dose-dependently inhibited p-Akt(ser473) suggesting that this compound acts as an inhibitor of mTORC2 as well in this cell line [47]. Thus, despite context-dependent effects on Akt activation, these results suggest that CAI down-regulates Mcl-1 translation through mTORC1 inhibition in ovarian carcinoma cells.

We then tempted to investigate the molecular link between SOCE inhibition and decrease of mTORC1 phosphorylation. For this purpose, we evaluated the involvement of CamKII activity, a calcium/calmodulin-stimulated serine/threonine protein kinase acting as one of the major calcium sensors in the cell. This protein was described to modulate several cellular processes as carcinogenesis by controlling cancer cell survival including mTOR activation [48;49]. Phosphorylated CamKII (Thr286) was expressed in the three cell lines at basal level, however CAI did not inhibit this kinase activation (Supp data 1), suggesting that this kinase is not involved in Mcl-1 inhibition induced by SOCE down-regulation.

Moreover, mTORC1 is known to be negatively controlled by phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK) [50]. As CAI inhibited mTORC1, we then tested if this compound was able to induce AMPK activation in our models. However, as illustrated, CAI did not triggered AMPK activation in the three cell lines tested suggesting that AMPK was not implicated in mTORC1 down-regulation and further investigation are required to elucidate the molecular pathway involved.

### 3.4 YM48583, a SOCE inhibitor down-regulates mTORC1 targets and Mcl-1

The involvement of SOCE in Mcl-1 down-regulation was confirmed by the use of YM58483, known as a potent SOCE inhibitor [51]. We first verified that this compound was able to inhibit store-operated calcium entry in our models. For this purpose, “Ca<sup>2+</sup> re-addition” protocol was studied in the three cell lines pre-treated or not with YM53483 and revealed that this compound did not inhibit calcium release triggered by thapsigargin in Ca<sup>2+</sup> depleted medium; however, as expected, it strongly reduced calcium entry *via* SOCE upon calcium reintroduction (Figure 4A).

We then evaluated if YM58483 mimicked the effect of CAI on mTORC1 and Mcl-1 expression. For this purpose, we treated our cells for 48h (IGROV1-R10) and 72h (OVCAR3 and SKOV3) with this SOCE inhibitor, and protein expressions were assessed by western blot. As depicted in figure 4B, this compound decreased phosphorylation of mTORC1(ser2448) and its downstream targets, p-4EBP1, p-p70S6K as well as Mcl-1 expression. Moreover, SOCE inhibitor did not down-regulate phosphorylation of Akt at residues Thr308 and Ser473, but like CAI, inhibited mTORC1 leading to a feedback loops that re-induce their activation as suggested by literature [47].

Finally, YM58843 neither deactivated CamKII nor induced AMPK phosphorylation strongly suggesting that CAI act as a SOCE inhibitor and that inhibiting SOCE down-regulates Mcl-1 through mTORC1 inhibition (Supp data 2).

### 3.5 SOCE inhibition by CAI or YM58483 combined with anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies leads to apoptosis in ovarian carcinoma

As Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 cooperate to protect ovarian carcinoma cells from apoptosis, we next evaluated the efficacy of CAI/anti-Bclx<sub>L</sub> strategies. First, we combined CAI with the BH3-mimetic ABT-737. As CAI-induced modulation of protein expression occurred slower than ABT-737-inhibited Bcl-x<sub>L</sub> activity, cells were pretreated with CAI 24h for IGROV1-R10 or 48h for OVCAR3 and SKOV3 cells and ABT-737 was added for the last 24h of treatment. As illustrated in figure 5A, this combination led to a drastic decrease of cell viability of the three cell lines (about -75% for IGROV1-R10, -90% for OVCAR3 and -80% for SKOV3 cells). This observation was supported by the potent increase of sub-G1 peaks in flow cytometry (Figure 5B) as well as by the occurrence of PARP and caspase 3 cleavages in western blot (Figure 5C). Moreover, CAI combination with siRNA targeting Bcl-x<sub>L</sub>, triggered massive apoptosis in the three cell lines as suggested by caspase 3 and PARP cleavages (Supp data 3). We then evaluated the efficacy of YM58483/ABT-737 combination in our carcinoma cell lines models. Whereas this SOCE inhibitor did not induce any cell death on its own at the concentrations tested, its combination with ABT-737 elicited a massive apoptosis, as displayed by caspase 3 and PARP cleavages and the emergence of a strong sub-G1 peak (Figure 5D and 5E). Altogether, these experiments illustrate that inhibiting SOC strongly sensitizes to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

#### 4. Discussion

Despite remarkable advances in the understanding of apoptosis resistance, no alternative to platinum-based therapy has been approved yet for ovarian cancer. Hence, the development of new therapeutic strategies represents a crucial challenge to improve the actual low survival rate of patients with advanced ovarian cancer. Several studies have shown that the anti-apoptotic proteins Bcl-x<sub>L</sub> and Mcl-1 could constitute key targets for future therapeutic strategies [7;52;53]. In this line, we previously demonstrated that calcium signaling modulation targeted Mcl-1 translation and constituted an attractive way to sensitize ovarian carcinoma to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies [13]. Our objective was then to test the effect of CAI, a calcium inhibitor used in clinical trials, on Mcl-1 expression and to evaluate its ability to sensitize ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies.

Our study showed that CAI elicited an anti-proliferative effect in the three ovarian cancer cell lines tested and this effect was consistent with several studies designed in other types of cancers for the same range of concentrations of CAI and for the same durations of treatment [36;37;39;54-56]. In our conditions, this effect was neither accompanied with a G2/M cell cycle arrest nor apoptotic feature as observed in other cancer cell lines [56-59]. This could be due to higher CAI concentrations (30 μM instead of 5 μM) or to longer times of treatment used in these studies. This hypothesis could also explain why in our conditions Bcl-2 was not decreased upon CAI as it was the case in MCF-7 breast cancer cell line [57]. Our results indicated that CAI potentially inhibited Mcl-1 expression in ovarian carcinoma cells. Its effect is not ascribed to caspase 3 cleavage suggesting that this inhibition is not a consequence of cell death as already described [43]. This finding is supported by our previous results demonstrating that Mcl-1 is decreased upon calcium signaling inhibition and to our knowledge, our study is the first to highlight that Mcl-1 represents a target for CAI in cancer cell lines.

The investigation of the molecular pathway involved highlighted that CAI drastically inhibited SOC in our experimental models suggesting that in ovarian carcinoma cells, CAI acts as a potent SOC inhibitor. SOC represents one of the major calcium channels in non-excitable cells. These channels are composed of 2 subunits, one belonging to ER membrane (STIM-1) and the other to cell plasma membrane (ORAI-1). Upon ER calcium depletion, these subunits interact with each other leading to a calcium influx from extracellular compartments in order to refill cytoplasm and ER stocks subsequently. Our finding is supported by other studies assessing that CAI has been shown to inhibit store-operated calcium channels in HEK293 [40], colon carcinoma cells [33], human endothelial cells [34] or endothelial progenitor cells isolated from patients [39]. In contrast, it did not significantly inhibit calcium release from IP3 receptor induced by thapsigargin as observed in HUVEC and Rat-1 cells [60].

CAI-induced Mcl-1 inhibition did not rely on transcriptional events and its effect was not reversed by proteasomal inhibition implying that post-translational events were not involved in Mcl-1 decrease. Mcl-1 down-regulation may be attributed to translational events as CAI strongly repressed p-4-EBP1 phosphorylation, which is known to control Mcl-1 protein expression [11;12]. This result totally correlates those we obtained



with the calcium chelator BAPTA-AM in the same experimental models. Indeed, we previously showed that BAPTA-AM treatment led to down-regulation of Mcl-1 that was counteracted by the overexpression of 4-EBP1 target (eIF4E) [13].

Control of PI3K-AKT-mTOR pathway by calcium is very complex as this second messenger can control different levels of this survival pathway.

Indeed, calcium/CaM was shown to activate p-Akt(ser473), and subsequently mTORC1, through CaMKII activation in B lymphocytes [30]. Consistent with this finding, SKF-96365, another SOCE inhibitor was described to inhibit the calcium/CaMKII/Akt/mTORC1-mediated pathway in colorectal cancer cells [48]. However, CAI did not inhibit the activation of CaMKII in our model of carcinoma cell. Other studies reported that calcium could activate this survival pathway through a calcium/CaM/CaMKK2 complex that bound to and activated p-Akt(thr308) in ovarian carcinoma cells [61]. Nevertheless, in our conditions, p-Akt(308) was not inhibited by CAI. Furthermore, CamKK2 major targets is AMPK protein and it could be hypothesized that decreasing calcium could lead to a down-regulation in CamKK2/AMPK pathway and consequently to an up-regulation of mTORC1 as previously described [62;63]. Nonetheless, the opposed result we obtained, implies that calcium/CamKK2 is not the main pathway targeted by CAI and that CamKK2 is not involved in mTORC1 and Mcl-1 down-regulation. In contrast, our results strongly suggest that SOCE inhibition by CAI impaired PI3K/Akt/mTOR by inactivating mTORC1 as evidence by the fact that phosphorylation of mTORC1(ser2448), p70S6K, 4-EBP1 proteins was strongly reduced. This effect was confirmed by the appearance of a transient upregulation of p-Akt(308) triggered by a compensatory feedback upon mTORC1 inhibition [64]. It is noteworthy that in OVCAR3 and SKOV3 cells, this feed-back loop also led to a transient up-regulation of p-Akt(473) due to the release of the inhibitory effect of mTORC1 on mTORC2 that phosphorylates Akt(473). However, this effect was not observed in IGROV1-R10 cell line suggesting that mTORC1 inhibition could lead to independent regulation of the two sites of phosphorylation. This conclusion is supported by several studies pointing that Akt(308) and Akt(473) reactivation upon mTORC1 depended on cellular context [47].

The hypothesis that calcium could play an important role in the regulation of mTOR signaling was evidence by calcium requirement for the activation of p70S6K [24-26]. Thereafter the role of calcium and calmodulin in mTORC1 activation was observed in a context of amino acid starvation [27]. Finally, lysosomal calcium was demonstrated to activate mTORC1 by inducing association of calmodulin with this kinase inciting the authors to postulate that mTORC1 could be regarded as a “atypical calmodulin-dependent kinase” [31]. It is noteworthy that in this latter study, authors showed that calcium/calmodulin regulates both mTORC1 and mTORC2. However mTORC1 was shown to be inhibited by calcium chelation or calmodulin inhibition for lower concentrations than those efficient to inhibit mTORC2. Hence, the author’s conclusion supports our finding that calcium inhibition could down-regulate mTORC1 activation independently of its action on Akt(473).

To consolidate our findings with CAI, we then tested the effect of YM-58483, a well-known SOC inhibitor, on SOC channels and Akt/mTOR activation in ovarian carcinoma cells. As expected YM58483 strongly down-regulated SOCE but had not impact on calcium release from IP3R comforting its action as SOCE inhibitor. Moreover, its effect on PI3K/Akt/mTOR pathway mimicked those obtained with CAI. Indeed, YM58483 potently

inhibited mTORC1 activation leading to compensatory feedback loops on Akt and to inhibition of mTORC1 down-stream targets p-P70S6K and p-4-EBP1. Finally, our results highlighted that this compound also drastically inhibited Mcl-1 expression strongly supporting that Mcl-1 is a target for SOCE inhibitors. The link between SOCE and the expression of Bcl-2 family members had already been pointed out by few studies but led to divergent conclusions. On the one hand, a constitutively active mutated STIM-1 led to an induction of Mcl-1 transcription in HEK293; on the other hand, ORAI1 knock-down promoted Mcl-1 and inhibited Noxa expressions leading to survival of mice activated T cell [65;66]. These discrepancies are probably inherent to the experimental model and further investigations are required to understand the molecular pathway involved.

Store-Operated Channels have a crucial role in tumor development and accumulating evidence supports their activation is involved in cancer progression. First, it was reported that these calcium channels are differentially expressed in malignant cells and STIM1 and ORAI1 were found more strongly expressed in hepatoma tissues than in precancerous tissues or non-tumor tissues of the same patients [67;68]. Second, these channels were demonstrated to have a crucial role in invasion of glioblastoma cells [69], angiogenesis of endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients [39], migration and metastasis of breast cancer cells [70] or cervical cancer cells [71]. Finally, SOCE inhibition sensitized various cancer cells to apoptosis. Indeed, SOCE inhibition potentiated 5-FU-induced inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway and synergized with 5-FU to induce cell death [68]. Besides, SKF96365 through calcium/CaMKII $\gamma$ /AKT/mTOR inhibition potentiated the anticancer effect of hydroxychloroquine in a mouse xenograft model [48]. At last, in ovarian carcinoma, STIM and ORAI1 were found higher expressed in cisplatin resistant cells (A2780cis) than in their sensitive counterpart (A2780) and combination of cisplatin with 2-APB, a SOC inhibitor, restored A2780cis sensitivity [72]. Taken together, these arguments highlight that SOC could constitute interesting predictive factors of cancer progression but also that targeting these channels could sensitize carcinoma cells to apoptosis.

On the basis of these results and those we previously obtained with BAPTA-AM[13], the combination of CAI or YM58483 with the BH3-mimetic ABT-737 was then investigated and revealed that these compounds strongly sensitized ovarian carcinoma cell lines to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies in the three cell lines tested. Because our experimental model is dependent of Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub> to survive, this result confirms that Mcl-1 constitutes a target for SOC channels. Moreover, the anti-tumoral effect of this combination could explain the mild efficacy of CAI when used as a single in clinical trials as the sole inhibition of Mcl-1 is not sufficient to induce apoptosis in ovarian cancer [41]. CAI has been tested in combination with several compounds and has been shown to potentiate the anti-tumoral activity of sorafenib [56], LM-1685, a celecoxib analogue [73] and 2-deoxyglucose [74]. However, to our knowledge, this is the first time that SOCE inhibitors were shown to sensitize to BH3-mimetic strategies. This could have interesting outcomes for ABT-263 (Navitoclax, the orally available ABT-737 analogue) clinical use. Indeed, because of its ability to antagonizing the survival function of Bcl-x<sub>L</sub> in platelets, this compound produces thrombocytopenia that represents its major dose-limiting side effect. In this context, as CAI synergizes with ABT-737, it may allow a dose reduction of ABT-263, alleviating the management of BH3-mimetic side effect.

In conclusion, we showed that CAI has anti-proliferative effect on ovarian cell lines and that it inhibits Mcl-1 expression through SOCE/mTORC1 inhibition which led to a strong sensitization of ovarian carcinoma to anti-Bcl-x<sub>L</sub> strategies. It could then be hypothesized that CAI *via* its action on SOCE and Mcl-1 could extent the therapeutic arsenal for ovarian cancer treatment if pertinently combined. As Store-Operated Channels are known to interact with the frequently deregulated PI3K/Akt/mTOR pathway, they could constitute relevant target to overcome apoptosis resistance in ovarian carcinoma.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

The research was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité départemental de l'Orne). MLB was funded by grant from Normandy Regional Council and Accord Healthcare Inc. We thank Marilyne Guillamin (Flow Cytometry Core Facility, SF 4206 ICORE of University of Caen Normandy) for technical assistance. We thank Dr Nicolas Vigneron (INSERM U1086, ANTICIPE) for his advice concerning statistical data and Dr Marie Villedieu for her careful reading.

### Legends

**Figure 1: CAI inhibits Mcl-1 protein expression and has an anti-proliferative effect on 3 ovarian cell lines. A)** Expressions of Mcl-1, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, were appreciated by western blot in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells were treated by increasing concentrations of CAI for 24h, 48h and 72h. Quantification of Mcl-1 protein expression upon CAI treatment in the 3 cell lines tested was realized with Image J software. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001 (n=3). **B)** Number of viable cells was assessed by blue trypan exclusion. Curves show the percentage of viable cells normalized to the number of viable cells at the beginning of the treatment (100%). Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **C)** Histograms represent the distribution of cells in cell cycle phase (sub-G1, G0-G1, S and G2-M) induced by 5 μM CAI for 48h (IGROV1-R10 cells) and 72h (for OVCAR3 and SKOV3 cells) and studied by flow cytometry. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **C)** The effect of 5μM CAI on PARP and caspase 3 cleavages was assessed by western blot for 24h, 48h and 72h in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cell lines.

**Figure 2: CAI does not bloc IP<sub>3</sub>R calcium release but inhibits Store-Operated Calcium Channel Entry. A)** Effect of CAI on IP<sub>3</sub>R and Store-operated calcium channels. Microspectrofluorimetry using Fura-2AM probe was realized in the 3 carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells. During exposure to 0Ca<sup>2+</sup>, depletion of the intracellular stores was triggered by the addition of 2 μM thapsigargin to the bathing medium. Subsequent replenishment of 2 mM Ca<sup>2+</sup> to the medium elicited a rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> due to Ca<sup>2+</sup> influx through open store-operated channels. Black tracings depict the representative changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> recorded from DMSO

treated cells and Grey tracings depict the representative changes in  $[Ca^{2+}]_i$  recorded from cells pre-treated 1h with 5 $\mu$ M CAI. **B)** Means  $\pm$  SEM of the amplitude of thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  store-operated channels entry recorded from CAI pre-treated cells (black bar) or not (DMSO) (white bar).

**Figure 3: Investigation of the mechanisms involved in CAI-induced Mcl-1 decrease** **A)** Cells were treated or not (DMSO) with 5  $\mu$ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h OVCAR3 or for SKOV3. Mcl-1 mRNA expression was assessed by real time quantitative RT-PCR. GAPDH was used as a housekeeping reference gene for normalization. Histograms represent the relative mRNA expression in treated cells normalized to that of control cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: NS: non-significant. **B)** Ovarian carcinoma cell lines were treated or not (DMSO) with 5  $\mu$ M CAI during 48h h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 72h for SKOV3 and 100 nM bortezomib were added for the last 24h of treatment. Mcl-1 expression was followed by western blot **C)** CAI decrease mTORC1 pathway. Cells were treated with increasing dose of CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 and SKOV3. The effect of CAI treatment on the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway was analyzed by studying the protein expression of P-Akt (S473 and T308) and total Akt, P-mTORC1 (ser2448) and P-mTORC2 (ser2448), P-p70S6K (T389) and total p70S6K and P-4E-BP1 (T70) and total 4E-BP1 by western blot analysis.

**Figure 4: YM48583 blocks store-dependent calcium entry and inhibits mTORC1 targets and Mcl-1.** **A)** Effect of YM-58483 on IP3R and Store-operated calcium channels. Microspectrofluorimetry using Fura-2AM probe was realized in the 3 carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells. During exposure to  $0Ca^{2+}$ , depletion of the intracellular stores was triggered by the addition of 2  $\mu$ M thapsigargin to the bathing medium. Subsequent replenishment of 2mM  $Ca^{2+}$  to the medium elicited a rise in  $[Ca^{2+}]_i$  due to  $Ca^{2+}$  influx through open store-operated channels. Black tracings depict the representative changes in  $[Ca^{2+}]_i$  recorded from DMSO treated cells and grey tracings depict the representative changes in  $[Ca^{2+}]_i$  recorded from cells pre-treated 1h with 15 $\mu$ M for IGROV1-R10 and OVCAR3 cells or 20 $\mu$ M For SKOV3 cells. **B)** Effect of YM58483 on Akt/mTORC1 pathway. Cells were treated with YM-58483 (15  $\mu$ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15  $\mu$ M for 72h for OVCAR3 cells and 20  $\mu$ M for 72h for SKOV3 cells. The effect of CAI treatment on the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway was analyzed by studying the protein expression of P-Akt (S473 and T308) and total Akt, p-mTORC1 (ser2448) and p-mTORC2 (ser2448), p-p70S6K (T389) and total p70S6K and P-4E-BP1 (T70) and total 4E-BP1 by western blot analysis.

**Figure 5: CAI or YM58483 combined with ABT-737 leads to apoptosis in ovarian carcinoma.** cells were treated or not (DMSO) with 5  $\mu$ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 72h for SKOV3 and 1  $\mu$ M ABT-737 was added 24h before the end of the experiment. **A)** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **B)** Sub-G1 events were studied by flow cytometry. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **C)** PARP and caspase 3 cleavages were assessed by western-

blot, **D**) YM58483 sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. Cells were treated with YM-58483 (15  $\mu$ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15  $\mu$ M for 72h for OVCAR3 cells and 20  $\mu$ M for 72h for SKOV3 cells. One micromolar ABT-737 was added the 24h last hour of treatment. PARP and caspase 3 cleavages were assessed by western-blot, **E**) YM58483 sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. Cells were treated with YM-58483 (15  $\mu$ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15  $\mu$ M for 72h for OVCAR3 cells and 20  $\mu$ M for 72h for SKOV3 cells. One micromolar ABT-737 was added the 24h last hour of treatment. Sub-G1 events were studied by flow cytometry.

**Supplementary data 1: Inhibition of Mcl-1 by CAI does not involve CamKII and AMPK.** Cells were treated with increasing dose of 5  $\mu$ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 and SKOV3. The effect of CAI treatment on p-CamKII, p-AMPK, AMPK, 4EBP1 and Mcl-1 was assessed by western blot.

**Supplementary data 2: Inhibition of Mcl-1 by YM58483 does not involve CamKII and AMPK.** Cells were treated with YM-58483 (15  $\mu$ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15  $\mu$ M for 72h for OVCAR3 cells and 20  $\mu$ M for 72h for SKOV3 cells). The effect of YM58483 treatment on p-CamKII, p-AMPK, AMPK, 4EBP1 and Mcl-1 was assessed by western blot.

**Supplementary data 3: CAI combined with siRNA targeting Bcl-x<sub>L</sub> leads to apoptosis in ovarian carcinoma** Cells were transfected with anti-Bcl-x<sub>L</sub> siRNA during 24h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 48h for SKOV3 then cells were treated with 5  $\mu$ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 or SKOV3. Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub> expressions and PARP and caspase 3 cleavages were studied by western blot.

## References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A et al. Cancer Statistics, 2017 Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.
2. Ledermann JA, Raja FA FAU, Fotopoulou CF, Gonzalez-Martin AF, Colombo NF, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**; 144: 646-674.
4. Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* **2013**; 13: 455-465.
5. Gloaguen C, Voisin-Chiret AS, Sopkova-de Oliveira SJ et al. First evidence that oligopyridines, alpha-helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies. *J Med Chem* **2015**; 58: 1644-1668.

6. Simonin K, N'diaye M, Lheureux S et al. Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis* **2013**; 18: 492-508.
7. Brotin E, Meryet-Figuere M, Simonin K et al. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int J Cancer* **2010**; 126: 885-895.
8. Kassem L, Abdel-Rahman O. Targeting mTOR pathway in gynecological malignancies: Biological rationale and systematic review of published data. *Crit Rev Oncol Hematol* **2016**; 108: 1-12.
9. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **2015**; 137: 173-179.
10. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **2011**; 474: 609-615.
11. Hsieh AC, Costa M, Zollo O et al. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* **2010**; 17: 249-261.
12. Mills JR, Hippo Y, Robert F et al. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105: 10853-10858.
13. Bonnefond ML, Lambert B, Giffard F et al. Calcium signals inhibition sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-xL strategies through Mcl-1 down-regulation. *Apoptosis* **2015**; 20: 535-550.
14. Anderson GR, Wardell SE, Cakir M et al. PIK3CA mutations enable targeting of a breast tumor dependency through mTOR-mediated MCL-1 translation. *Sci Transl Med* **2016**; 8: 369ra175.
15. Faber AC, Li D, Song Y et al. Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**; 106: 19503-19508.
16. Jebahi A, Villedieu M, Petigny C et al. PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BE2325 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-x-targeting strategies, provided that Bim expression is induced. *Cancer Lett* **2014**.
17. Zervantonakis IK, Iavarone C, Chen HY et al. Systems analysis of apoptotic priming in ovarian cancer identifies vulnerabilities and predictors of drug response. *Nat Commun* **2017**; 8: 365.
18. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**; 1: 11-21.
19. Prevarskaya N, Ouadid-Ahidouch H, Skryma R, Shuba Y. Remodelling of Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2014**; 369: 20130097.

20. Cui C, Merritt R, Fu L, Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* **2017**; 7: 3-17.
21. Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* **2017**; 17: 367-380.
22. Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* **2012**; 287: 31666-31673.
23. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Targeting Ca<sup>2+</sup>(+) transport in cancer: close reality or long perspective? *Expert Opin Ther Targets* **2013**; 17: 225-241.
24. Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB. Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J Biol Chem* **1998**; 273: 4776-4782.
25. Hannan KM, Thomas G, Pearson RB. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem J* **2003**; 370: 469-477.
26. Graves LM, He Y, Lambert J, Hunter D, Li X, Earp HS. An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells. *J Biol Chem* **1997**; 272: 1920-1928.
27. Gulati P, Gaspers LD, Dann SG et al. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca<sup>2+</sup>/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* **2008**; 7: 456-465.
28. Mercan F, Lee H, Kolli S, Bennett AM. Novel role for SHP-2 in nutrient-responsive control of S6 kinase 1 signaling. *Mol Cell Biol* **2013**; 33: 293-306.
29. Zhou X, Lin DS, Zheng F, Sutton MA, Wang H. Intracellular calcium and calmodulin link brain-derived neurotrophic factor to p70S6 kinase phosphorylation and dendritic protein synthesis. *J Neurosci Res* **2010**; 88: 1420-1432.
30. Ke Z, Liang D, Zeng Q et al. hsBAFF promotes proliferation and survival in cultured B lymphocytes via calcium signaling activation of mTOR pathway. *Cytokine* **2013**; 62: 310-321.
31. Li RJ, Xu J, Fu C et al. Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *Elife* **2016**; 5.
32. Antoniotti S, Fiorio PA, Pregolato S, Mottola A, Lovisolo D, Munaron L. Control of endothelial cell proliferation by calcium influx and arachidonic acid metabolism: a pharmacological approach. *J Cell Physiol* **2003**; 197: 370-378.
33. D'Amato M, Flugy AM, Alaimo G et al. Role of calcium in E-selectin induced phenotype of T84 colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 301: 907-914.

34. Faehling M, Kroll J, Fohr KJ et al. Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J* **2002**; 16: 1805-1807.
35. Fiorio PA, Grange C, Antoniotti S et al. Arachidonic acid-induced Ca<sup>2+</sup> entry is involved in early steps of tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* **2008**; 6: 535-545.
36. Moody TW, Chiles J, Moody E, Sieczkiewicz GJ, Kohn EC. CAI inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* **2003**; 39: 279-288.
37. Wu Y, Palad AJ, Wasilenko WJ et al. Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clin Cancer Res* **1997**; 3: 1915-1921.
38. Enfissi A, Prigent S, Colosetti P, Capiod T. The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* **2004**; 36: 459-467.
39. Lodola F, Laforenza U, Bonetti E et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One* **2012**; 7: e42541.
40. Mignen O, Brink C, Enfissi A et al. Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J Cell Sci* **2005**; 118: 5615-5623.
41. Hussain MM, Kotz H, Minasian L et al. Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* **2003**; 21: 4356-4363.
42. Lesept F, Chevilly A, Jezequel J et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors.
43. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* **2010**; 584: 2981-2989.
44. Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW, Jr. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* **2008**; 46: 204-212.
45. Jardin I, Rosado JA. STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim Biophys Acta* **2016**; 1863: 1418-1426.
46. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* **1991**; 266: 17067-17071.

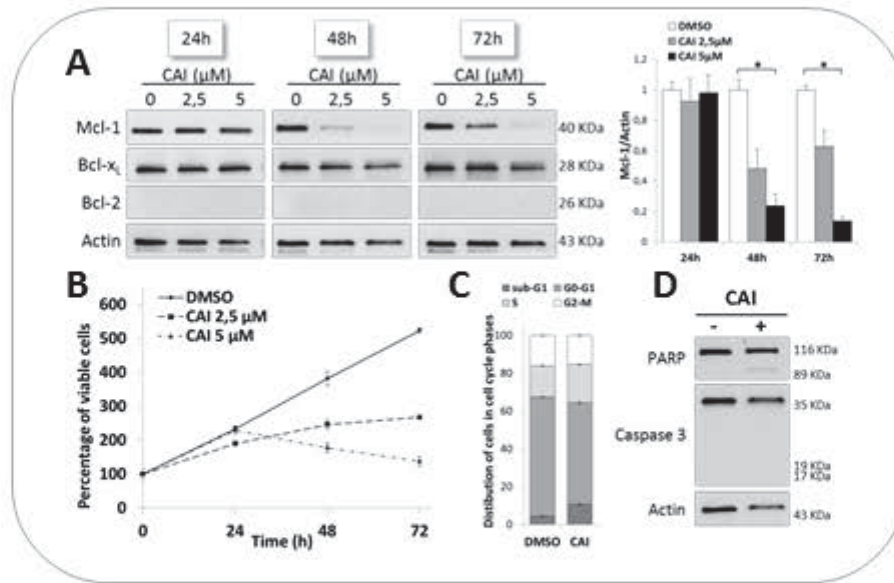


47. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C et al. Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* **2009**; 8: 742-753.
48. Jing Z, Sui X, Yao J et al. SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKIIgamma/AKT-mediated pathway. *Cancer Lett* **2016**; 372: 226-238.
49. Wang YY, Zhao R, Zhe H. The emerging role of CaMKII in cancer.
50. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **2011**; 13: 1016-1023.
51. Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T et al. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca<sup>2+</sup> influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* **2003**; 170: 4441-4449.
52. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* **2007**; 67: 782-791.
53. Lucas KM, Mohana-Kumaran N, Lau D et al. Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737. *Clin Cancer Res* **2012**; 18: 783-795.
54. Alessandro R, Fontana S, Giordano M et al. Effects of carboxyamidotriazole on in vitro models of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *J Cell Physiol* **2008**; 215: 111-121.
55. Lambert PA, Somers KD, Kohn EC, Perry RR. Antiproliferative and antiinvasive effects of carboxyamidotriazole on breast cancer cell lines. *Surgery* **1997**; 122: 372-378.
56. Chen C, Ju R, Shi J et al. Carboxyamidotriazole Synergizes with Sorafenib to Combat Non-Small Cell Lung Cancer through Inhibition of NANOG and Aggravation of Apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* **2017**; 362: 219-229.
57. Guo L, Li ZS, Wang HL, Ye CY, Zhang DC. Carboxyamido-triazole inhibits proliferation of human breast cancer cells via G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Pharmacol* **2006**; 538: 15-22.
58. Yang JL, Qu XJ, Yu Y, Kohn EC, Friedlander ML. Selective sensitivity to carboxyamidotriazole by human tumor cell lines with DNA mismatch repair deficiency. *Int J Cancer* **2008**; 123: 258-263.
59. Ge S, Rempel SA, Divine G, Mikkelsen T. Carboxyamido-triazole induces apoptosis in bovine aortic endothelial and human glioma cells. *Clin Cancer Res* **2000**; 6: 1248-1254.
60. Rodland KD, Wersto RP, Hobson S, Kohn EC. Thapsigargin-induced gene expression in nonexcitable cells is dependent on calcium influx. *Mol Endocrinol* **1997**; 11: 281-291.

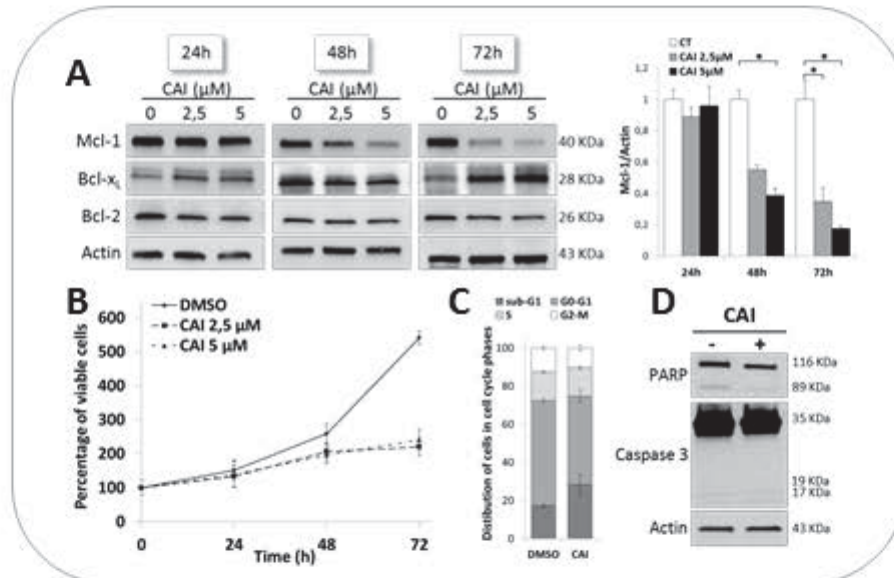
61. Gocher AM, Azabdaftari G, Euscher LM et al. Akt activation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **2017**; 292: 14188-14204.
62. Hoyer-Hansen M, Jaattela M. AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* **2007**; 3: 381-383.
63. Yang J, Yu J, Li D et al. Store-operated calcium entry-activated autophagy protects EPC proliferation via the CAMKK2-MTOR pathway in ox-LDL exposure. *Autophagy* **2017**; 13: 82-98.
64. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**; 149: 274-293.
65. Kim KD, Srikanth S, Yee MK, Mock DC, Lawson GW, Gwack Y. ORAI1 deficiency impairs activated T cell death and enhances T cell survival. *J Immunol* **2011**; 187: 3620-3630.
66. Hewavitharana T, Deng X, Wang Y et al. Location and function of STIM1 in the activation of Ca<sup>2+</sup> entry signals. *J Biol Chem* **2008**; 283: 26252-26262.
67. Yang N, Tang Y, Wang F et al. Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett* **2013**; 330: 163-169.
68. Tang BD, Xia X, Lv XF et al. Inhibition of Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry enhances chemosensitivity of HepG2 hepatocarcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Cell Mol Med* **2017**; 21: 904-915.
69. Motiani RK, Hyzinski-Garcia MC, Zhang X et al. STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch* **2013**; 465: 1249-1260.
70. Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **2009**; 15: 124-134.
71. Chen YF, Chiu WT, Chen YT et al. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108: 15225-15230.
72. Schmidt S, Liu G, Liu G et al. Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca<sup>2+</sup> entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget* **2014**; 5: 4799-4810.
73. Winters ME, Mehta AI, Petricoin EF, III, Kohn EC, Liotta LA. Supra-additive growth inhibition by a celecoxib analogue and carboxyamido-triazole is primarily mediated through apoptosis. *Cancer Res* **2005**; 65: 3853-3860.
74. Ju R, Guo L, Li J et al. Carboxyamidotriazole inhibits oxidative phosphorylation in cancer cells and exerts synergistic anti-cancer effect with glycolysis inhibition. *Cancer Lett* **2015**.

Figure 1, Bonnefond et al.

IGROV1-R10



OVCAR3



SKOV3

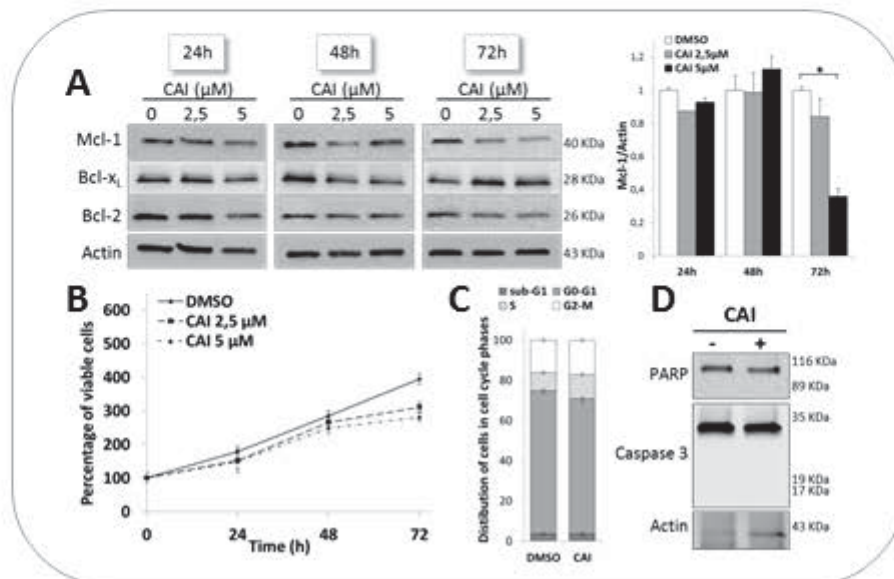


Figure 2, Bonnefond et al.

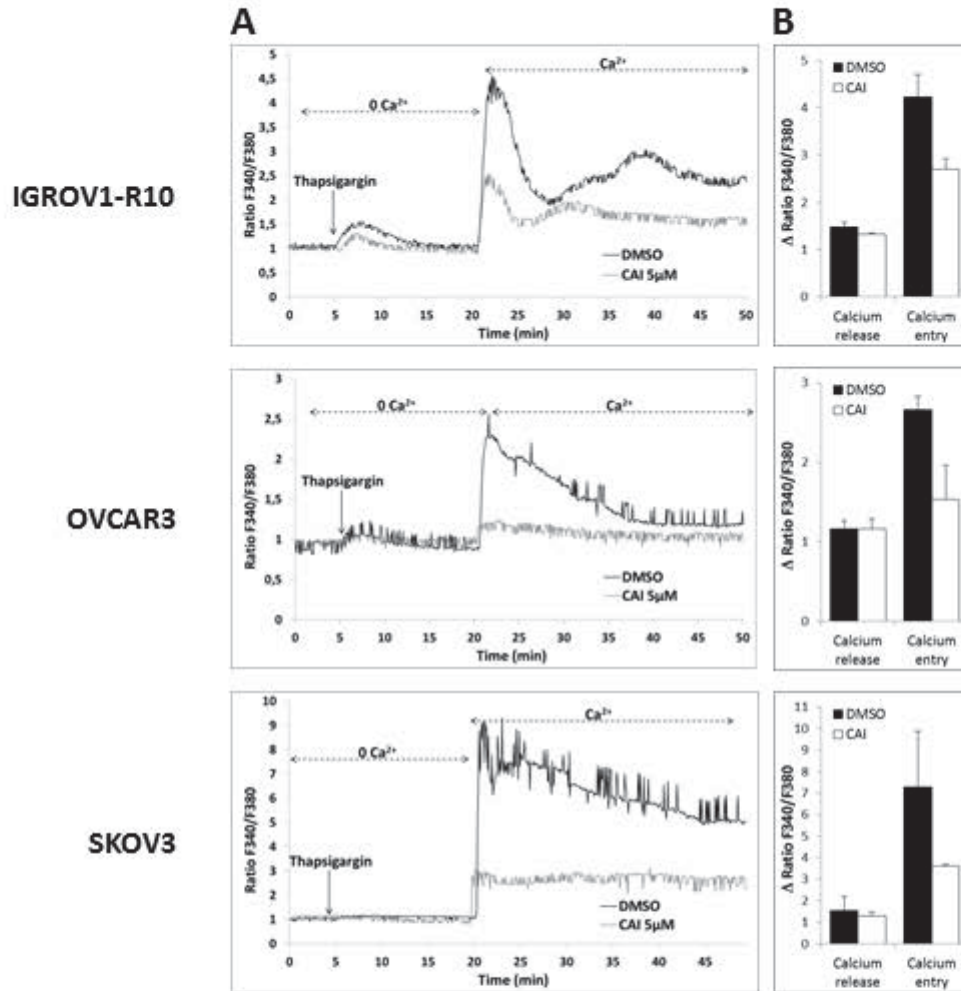


Figure 3, Bonnefond et al.

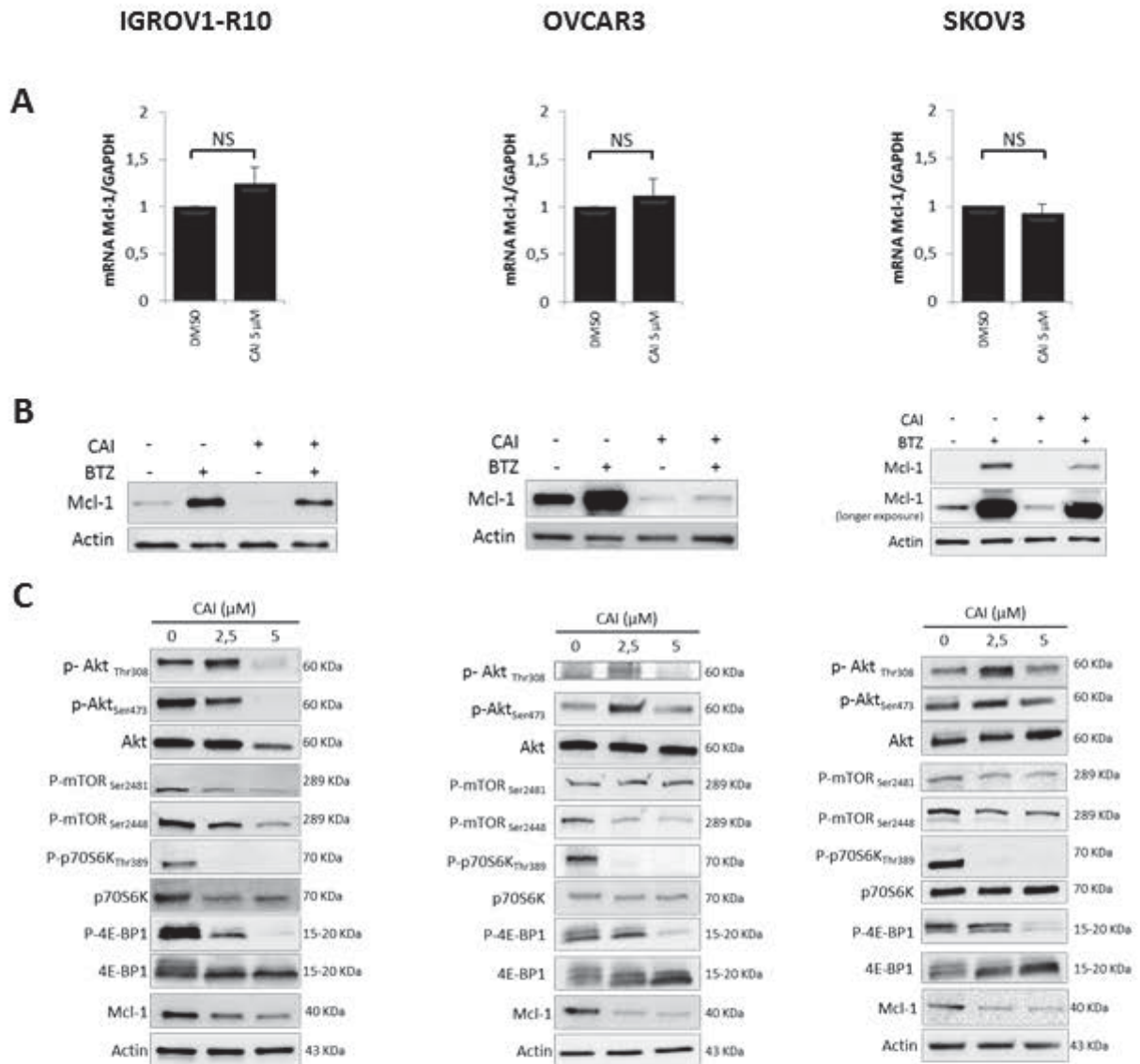


Figure 4, Bonnefond et al.

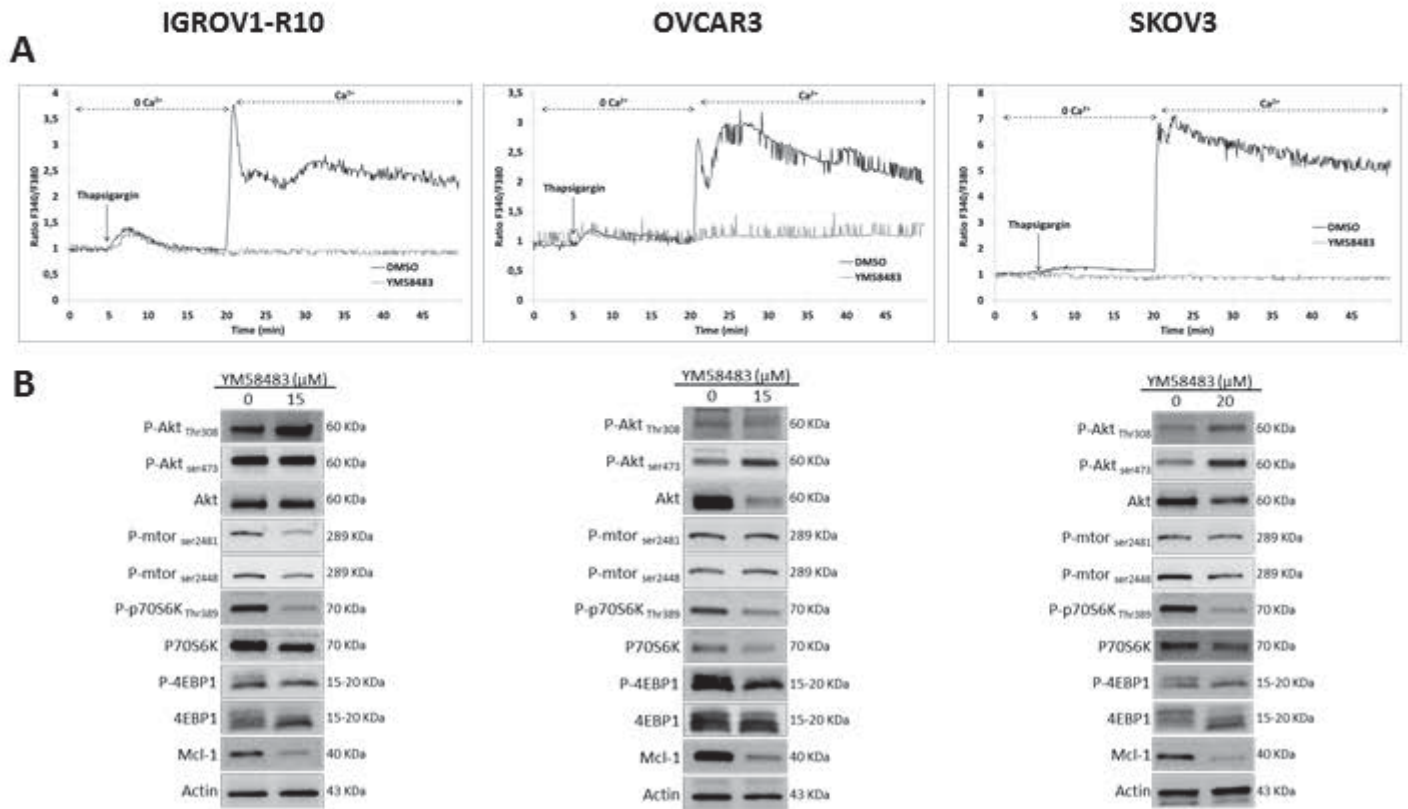
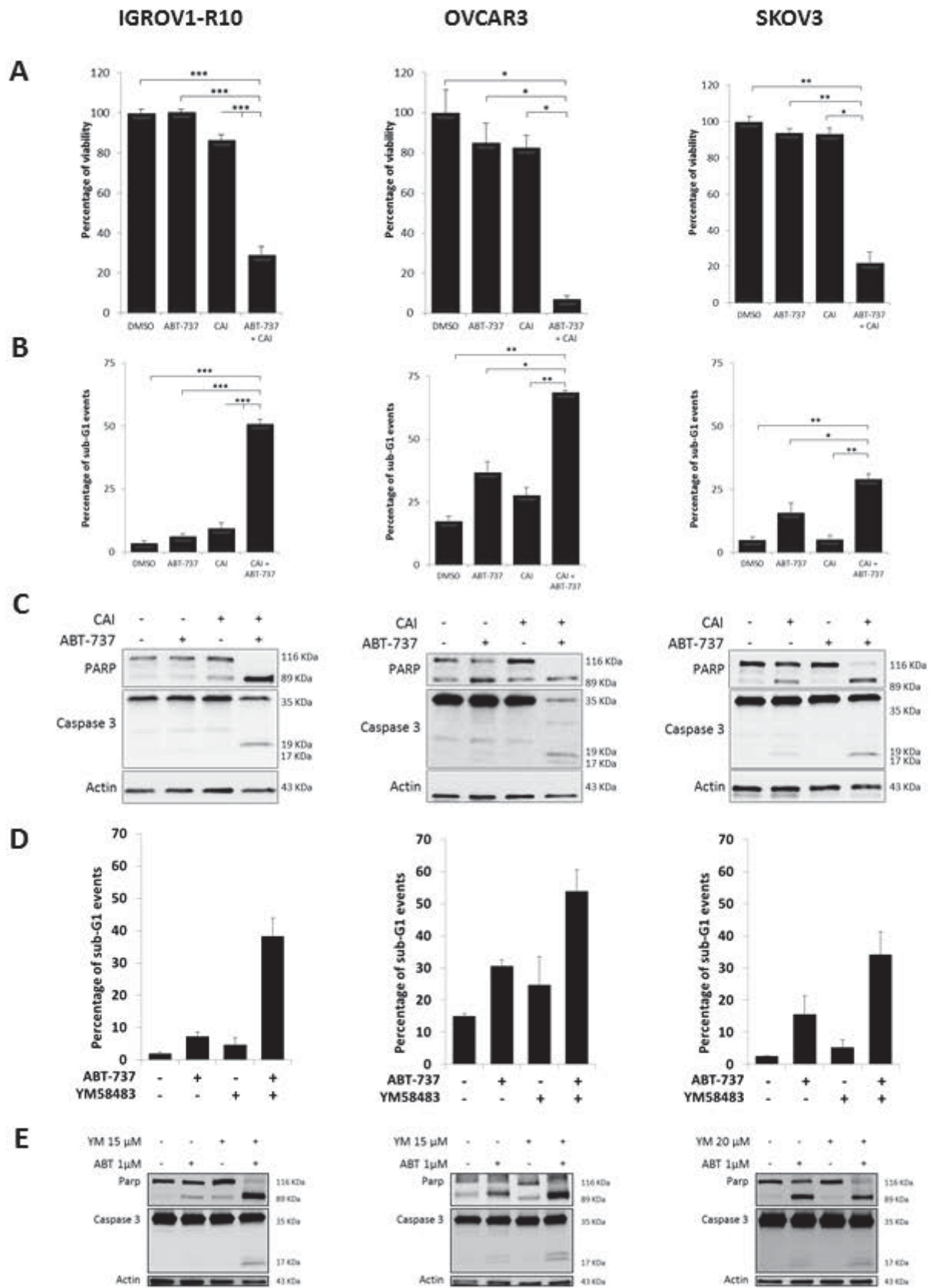
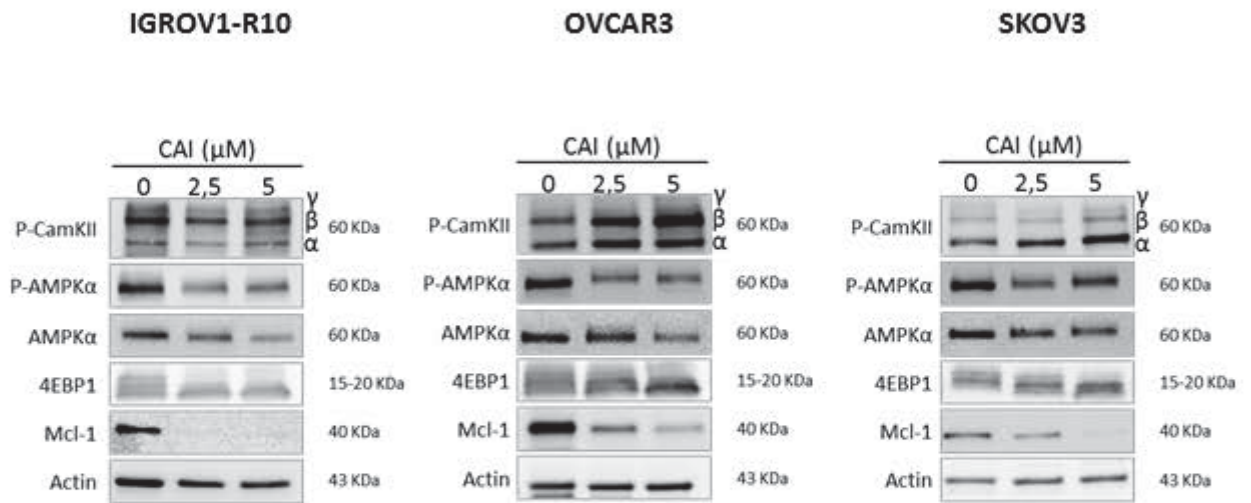
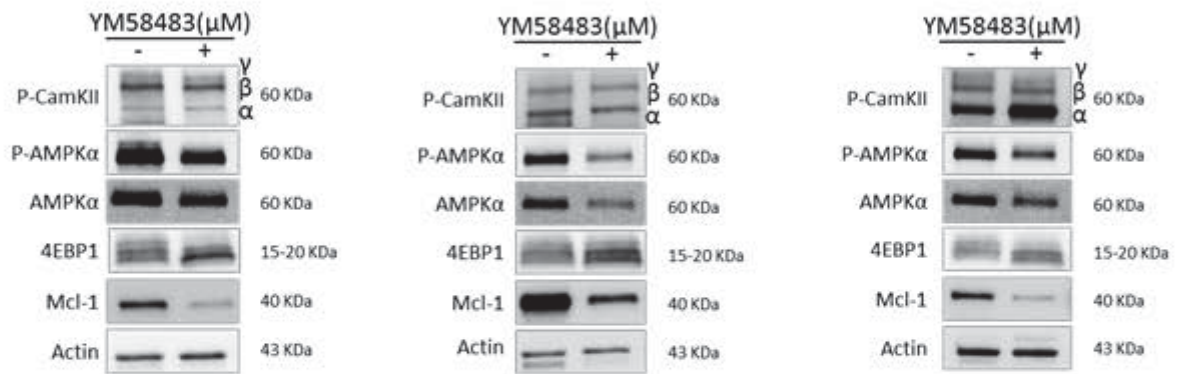


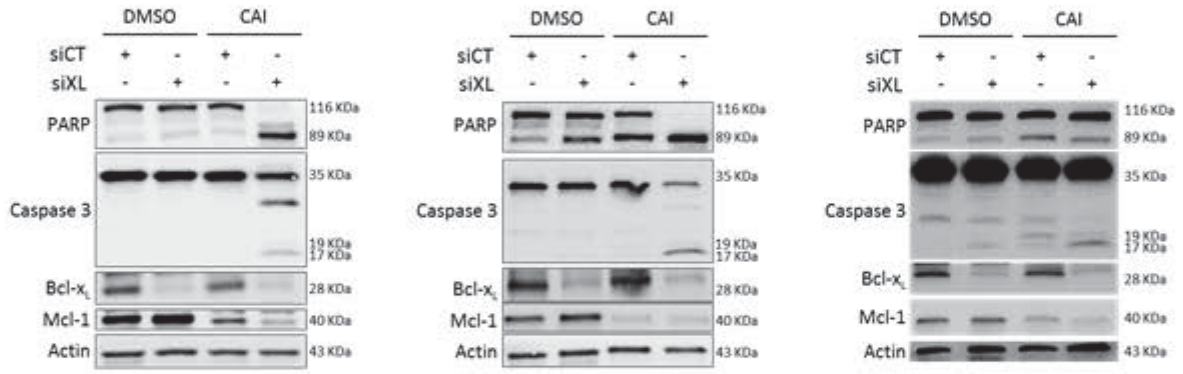
Figure 5, Bonnefond et al.











## Conclusions :

Cette étude a permis de mettre en évidence que le CAI a un effet anti-prolifératif et qu'il inhibe Mcl-1 dans trois lignées cancéreuses ovariennes chimiorésistantes IGROV1-R10, SKOV3 et OVCAR3. Comme le traitement avec le BAPTA-AM, cette inhibition n'est ni transcriptionnelle, ni post-traductionnelle, mais se situe au niveau de la traduction, *via* l'inhibition de mTORC1. Nous nous sommes alors demandés comment le CAI modulait les flux calciques dans nos cellules et avons montré que cette molécule n'inhibait pas les IP3R mais l'entrée de calcium capacitive (SOCE). En utilisant un autre inhibiteur de cette entrée de calcium capacitive, le YM58483, nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de ce flux de calcium permettait d'inhiber mTORC1 et Mcl-1. Enfin nous avons montré que la combinaison du CAI ou du YM58483 avec l'ABT-737 permettait de restaurer l'apoptose au sein de nos trois lignées de cellules ovariennes chimiorésistantes.

En plus du lien connu entre l'entrée de calcium capacitive et la voie PI3K/Akt/mTOR, cette étude renforce la pertinence de cibler les canaux calciques capacitifs pour inhiber cette voie, en particulier dans les cancers de l'ovaire où elle est très fréquemment dérégulée. (Mabuchi et al., 2015) (Jing et al., 2016) De plus, l'utilisation du CAI pour inhiber Mcl-1 *via* l'inhibition des canaux calciques capacitifs pourrait élargir le champ d'action de cette molécule thérapeutique et permettre notamment son utilisation comme agent sensibilisateur aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> dans les cancers ovariens.

## Données supplémentaires de l'article : "Store-operated channels pathway inhibition by carboxyamidotriazole sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bclx<sub>L</sub> strategies through Mcl-1 down-regulation".

### Contexte de l'expérience

Les résultats obtenus sur les lignées tumorales ovariennes *in vitro* nous ont incités à évaluer l'action du CAI sur un modèle *ex vivo* de tranches tumorales développé au laboratoire. Ce modèle, plus pertinent que les lignées cellulaires en termes histologiques, biologiques et moléculaires, est obtenu par coupe au vibratome de nodules de carcinose péritonéale d'origine ovarienne prélevés au moment de la chirurgie initiale et après mise en culture *ex vivo* à 37°C (Lheureux et al., 2015). L'approche des coupes de tumeur est très prometteuse pour mimer le tissu tumoral et en reproduire plus fidèlement la réponse aux traitements. Une récente étude a ainsi démontré l'intérêt de ce modèle pour prédire la réponse de patients atteints de carcinomes de la tête et du cou et cancers colorectaux à différents agents anticancéreux (Majumder et al., 2015).

### Matériel et méthodes

- Exposition à CAI

Immédiatement après la chirurgie, des nodules de patientes ont été tranchés au vibratome (400 µm) puis traités avec le véhicule (DMSO) ou 5µM de CAI dans un milieu de culture complet préchauffé stérile additionné de 1% d'antibiotique (Gibco) et incubé dans une atmosphère humidifiée 5% CO<sub>2</sub> à 37 C °. Après traitement, les tranches ont ensuite été fixées avec du PFA à 3%. L'histologie de tous les échantillons a été confirmée par un pathologiste certifié.

- Analyse immunohistochimique

Une analyse d'immunohistochimie utilisant l'automate Ventana Discovery XT a été réalisée sur des coupes de paraffine de 4 µm d'épaisseur. Les lames ont été déparaffinées avec du tampon EZPrep et les épitopes ont été démasqués par un traitement à haute température de 15 minutes dans du tampon CC1 EDTA. Les sections ont été incubées pendant 40 minutes à 37 °C avec un anticorps anti-Mcl-1 (# ab32087, Abcam). L'anticorps secondaire (Omnimap Rabbit Ventana) a été incubé pendant 16 minutes à 37 °C. Après lavage, la coloration a été réalisée avec du DAB et les sections ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline en utilisant des réactifs Ventana selon le protocole du fabricant.

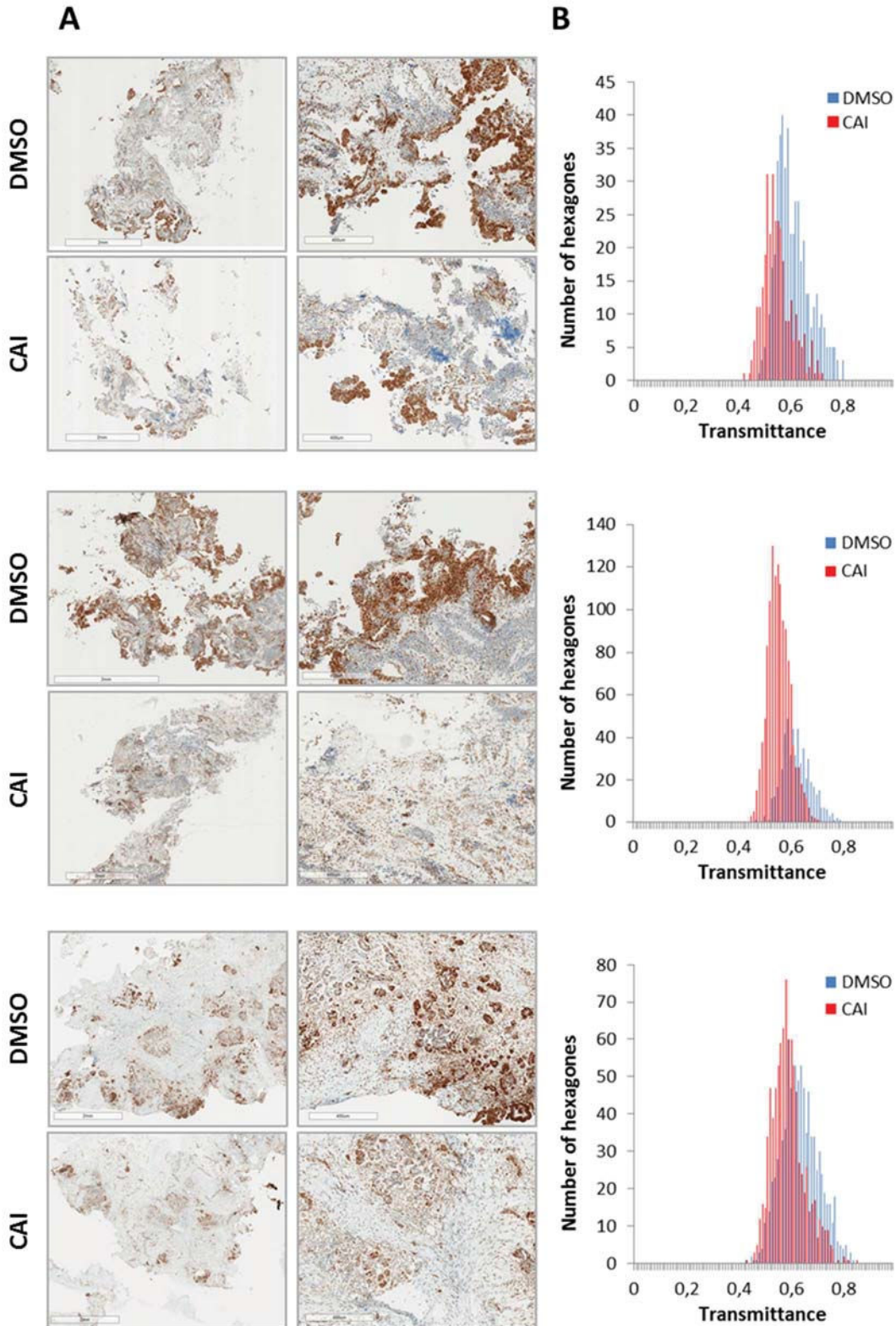
- Acquisition d'image

Des images de lames entières des sections histologiques ont été numérisées à  $20 \times$  ( $0,5 \mu\text{m}$  / pixel) en utilisant le scanner de lames microscope ScanScope CS (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne). Elles ont été enregistrées en tant qu'images tiff.

- Traitement d'image

Pour chaque image, une région d'intérêt (ROI) a été dessinée en utilisant le logiciel ImageScope (Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne). Les ROI ont été sous-échantillonnées par pavage hexagonal comme décrit dans l'étude précédente (Plancoulaine et al., 2015) pour prendre en compte l'hétérogénéité intra-tumorale.

Les images sont traitées en utilisant un programme en langage de programmation Python avec les bibliothèques Openslide, Scikit-image et Mahotas (Goode et al., 2013) (van der Walt et al., 2014). Un seuil automatique sur le composant bleu de l'image couleur est appliqué pour calculer les zones de tissu dans les ROI. Pour la détection de la couleur brune qui correspond à l'immuno-coloration DAB, une Deconvolution Ruifrok a été utilisée. Les images avec immuno-coloration MCL-1 ont été calculées comme une transmittance intégrale entre 0 et 1 pour décrire l'intensité de la coloration dans chaque hexagone.



**Le CAI inhibe Mcl-1 *ex vivo* dans des échantillons de tumeurs de patients.**

A) Des nodules de patients tranchés au vibratome ont été traités avec du DMSO ou du CAI pendant 48 h. Les tranches ont ensuite été incluses dans la paraffine et l'immunohistochimie de Mcl-1 a été réalisée. B) Pour la quantification de la coloration de Mcl-1, les ROI ont été dessinés et sous-échantillonnés en hexagones. La mesure de l'intensité de la couleur brune a été traduite en transmittance comprise entre 0 et 1 pour décrire l'intensité de la coloration de Mcl-1 dans chaque hexagone: une faible transmittance reflète une mauvaise coloration tandis qu'une transmittance élevée reflète une forte coloration. Les histogrammes illustrent la distribution des hexagones en fonction de la valeur de leur facteur de transmission dans les conditions DMSO et CAI.

## Résultats

A cet effet, chaque échantillon de tumeur provenant de patientes atteintes d'un cancer ovarien naïf de chimiothérapie a été tranché au vibratome (400 µm) et les tranches du même nodule ont été traitées avec du véhicule (DMSO) ou 5 µM de CAI pendant 48h. L'immunohistochimie a révélé que lors du traitement par le CAI, l'expression de Mcl-1 était fortement inhibée. Afin de quantifier cette inhibition, les lames ont été virtuellement divisées en hexagones (de 160µm de diamètre) et l'intensité (transmittance) de la coloration a été évaluée aux moyens d'outils d'histo-imagerie. Les histogrammes ont révélé que pour les conditions CAI (Rouge), la majorité des hexagones présentait une intensité de coloration plus faible que ceux présentés dans les conditions de DMSO (Bleu) confirmant la diminution de l'expression de Mcl-1. Ces expériences réalisées sur 3 nodules provenant de deux patientes différentes donnent des résultats encourageants qui nécessiteront d'être reproduits.

## Conclusion:

Cette étude *ex vivo* montre que le CAI est capable d'inhiber Mcl-1 dans des modèles plus proches de la clinique. Les résultats de cette étude restent cependant à confirmer du fait d'un nombre trop faible d'échantillons. L'étude *ex vivo* menée précédemment par l'équipe avait révélé que l'ABT-737 était capable d'induire la mort cellulaire lorsqu'il était administré en tant qu'agent unique seulement sur certains échantillons de tumeurs (14/25 échantillons), mais soutenant des observations antérieures dans le carcinome *ex vivo* de la prostate (Lheureux et al., 2015) (Bray et al., 2009). L'identification des facteurs prédictifs au traitement à l'ABT-737 a mis en évidence que Bim (connue pour séquestrer Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1) jouait le rôle d'un facteur prédictif clé. Ainsi, une signature prédictive de la réponse à l'ABT-737 a été proposée : les tumeurs Bim *high* répondaient à l'ABT-737 ainsi que les Bim *low* si et seulement si Mcl-1 ou p-ERK étaient également *low*. Cependant, 44% des tumeurs n'ont pas répondu à l'ABT-737 ni à sa combinaison avec le carboplatine, résultat qui s'expliquait par une forte expression de Mcl-1, impliquée dans la résistance au traitement par l'ABT-737. Dans la mesure où le CAI conduit à une diminution de Mcl-1, on pourrait alors envisager que CAI représenterait une stratégie pertinente pour sensibiliser les carcinomes ovariens à l'ABT-737 chez ces patientes.

## Partie 3 : le carboxyamidotriazole induit un nouveau type de mort : l'autosis

Les cancers de l'ovaire restent les cancers gynécologiques ayant le pronostic le plus sombre et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer leur prise en charge. Une des caractéristiques majeures des cancers de l'ovaire réside dans leur capacité à échapper aux traitements conventionnels après une bonne réponse à la chimiothérapie initiale. Cette adaptation s'explique entre autre par la modulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2 dont la fonction est de réguler l'entrée en apoptose. Ainsi, il a été montré que les cellules se trouvent dans un état dit « primed to death », c'est-à-dire que l'ensemble des facteurs pro-apoptotiques activés par le stress oncogénique se trouve séquestré par les anti-apoptotiques. Cette augmentation du ratio (anti / pro-apoptotiques) se révèle être une opportunité thérapeutique puisque la seule inhibition des anti-apoptotiques suffit à précipiter la cellule vers la mort cellulaire. Ainsi, nous avons démontré que les anti-apoptotiques Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 se révèlent être des cibles pertinentes pour le traitement des cancers ovariens.

Bien qu'il existe des inhibiteurs spécifiques de Bcl-x<sub>L</sub> : les BH3-mimétiques, cibler Mcl-1 reste encore difficile. Nous avons montré que la voie de signalisation calcique avait un intérêt pour inhiber Mcl-1 et que la chélation calcique était capable d'inhiber mTORC1 et ses protéines cibles (p-4EBP1 et p-P70S6K) impliquées dans la traduction de Mcl-1. Ainsi, la combinaison d'inhibiteurs calciques à des stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> induit une mort massive des cellules cancéreuses ovariennes. Par ailleurs, nous avons montré que le carboxyamidotriazole (inhibiteur des store-operated channels), molécule ayant passé plusieurs essais cliniques et également capable d'inhiber Mcl-1 possédait également une action cytotoxique lorsqu'il est associé à l'ABT-737.

Lors de cette étude, nous avons observé que le CAI induisait des changements morphologiques importants en particulier pour la lignée IGROV1-R10. De plus, des temps d'exposition plus longs entraînent une mort de ces cellules. Nous nous sommes donc intéressés à ces phénomènes et avons tenté de les décrypter.



## Matériel et Méthodes

### 1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens humains utilisées dans cette étude sont les SKOV3 et IGROV1-R10, et OVCAR3 résistantes aux dérivés du platine. Les SKOV3 et les OVCAR3 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les IGROV1-R10 proviennent des IGROV1 (offertes par le Pr. Jean Benard de l'Institut Gustave Roussy) et ont été rendues résistantes au cisplatine par des expositions répétées à cet anti-néoplasique.

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 25cm<sup>2</sup> dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibeco, Saint Aubin, France) supplémenté par 20 mM d'Hepes, 10% de sérum de veau foetal (SVF Gibeco, Saint Aubin, France) décomplémenté et 0,075% de bicarbonate de sodium. Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide et enrichie en CO<sub>2</sub>. Ces deux lignées poussent en monocouche et leur temps de doublement est estimé à 24h.

### 2. Réactifs de traitement

Les molécules thérapeutiques utilisées pour traiter les cellules sont le Carboxyamidotriazole (CAI), (TOCRIS, Bristol, Royaume-Uni) dissout dans le DMSO (Selleckchem, Souffelyersersheim, France) et conservées à -20°C sous forme de solution stock.

### 3. Arrêt de culture

#### *a. Arrêt en trypsine*

Pour arrêter les traitements, le milieu de culture est retiré et le tapis cellulaire rincé deux fois avec du PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, H<sub>2</sub>O qsp 1L, pH 7,2) à 37°C. Puis, de la trypsine (Gibeco) à 37°C est ajoutée dans la flasque et celle-ci est placée à l'étuve (37°C) pendant environ 2min. Une fois les cellules décollées, l'action de la trypsine est inhibée par ré-introduction du milieu de culture. Le reste de la suspension est par la suite centrifugé à 2000rpm pendant 5min. Le culot, contenant les cellules, est resuspendu dans du PBS 1X froid. Une première partie est utilisée pour réaliser un comptage des cellules et une deuxième partie est centrifugée à 2000rpm pendant 5min. Les culots cellulaires obtenus sont conservés à -80°C en vue de la réalisation de western blots ou d'une PCR en temps réel. Le reste des cellules est conservé dans de l'éthanol à 70% à -20°C en vue de la réalisation d'analyse par cytométrie en flux.

#### *b. Arrêt sur tapis sec*

L'arrêt sur tapis sec permet de réaliser la détection par western blot de la phosphorylation des protéines impliquées dans les voies de transduction. Le milieu de culture est retiré et centrifugé à 2000rpm pendant 5min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire, contenant les cellules mortes ou décollées, est resuspendu dans du PBS froid. Après une nouvelle centrifugation à 2000rpm pendant 5min, le culot est conservé à -80°C en vue de la réalisation de western blots. Parallèlement à cela, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du PBS froid, et après élimination du PBS, les flasques sont placées à -80°C.

#### **4. Comptage des cellules**

Le nombre de cellules est obtenu par comptage sur cellule de Malassez. Au préalable, la suspension cellulaire est mise en présence de bleu de trypan, colorant qui ne pénètre que dans les cellules mortes, ce qui permet de ne prendre en compte que les cellules viables.

#### **5. Etude du cycle cellulaire en cytométrie en flux**

*Principe* : L'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium, molécule fluorescente qui s'intercale aux acides nucléiques. Il absorbe la lumière à 540 nm et émet une fluorescence à 625 nm. La mesure de cette fluorescence est réalisée grâce au cytomètre en flux, celle-ci est proportionnelle à la quantité d'ADN dans les cellules.

Les cellules fixées dans l'éthanol à 70% sont centrifugées 5 minutes à 4000 rpm. L'alcool est éliminé et les cellules sont suspendues dans du PBS 1X chaud 30 minutes à 37°C. Cela permet le gonflement des cellules et l'éjection des corps apoptotiques, grâce à une seconde centrifugation de 5 minutes à 4000 rpm. Après élimination du surnageant, un agent perméabilisant «LPR» (Kit DNA Prep, Beckman Coulter, Villepinte, France) contenant de la RNase et une solution «STAIN» (Kit DNA Prep, Beckman Coulter, Villepinte, France) d'iodure de propidium sont ajoutés sur les cellules. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les échantillons sont analysés au cytomètre en flux GALLIOS™ (Beckman Coulter, France).

#### **6. Analyse protéique par western blot**

*Lyse cellulaire* : Les cellules sont lysées dans du tampon Lysis Buffer (Lysis Buffer 2X, 0,5% de DDM (n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside), 5μM de GDP, 1μM de microcystine, 1mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, ½ tablette complète de Boehringer, H<sub>2</sub>O qsp 10mL), tampon de lyse permettant de conserver la structure des protéines membranaires. Lorsque les traitements ont été arrêtés en trypsine, les culots cellulaires

sont resuspendus dans un volume adapté de ce tampon de lyse. Après 30 min sur glace, les suspensions sont centrifugées à 10000rpm pendant 10min. Le surnageant contenant les protéines cellulaires est conservé à -80°C.

Lorsque les traitements ont été arrêtés sur tapis sec, un volume adapté de tampon de lyse est déposé dans les flasques et celles-ci sont grattées pour récupérer les cellules. L'ensemble est ensuite utilisé pour resuspendre le culot cellulaire et le tout est mis à incuber 30 min sur glace. La suite du protocole est identique à celui de l'arrêt en trypsine.

Dosage protéique : Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford, basée sur la formation des complexes protéines-bleu de Coomassie possédant un pic d'absorption à 595nm. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec de la BSA (Bovin Serum Albumin) dans 1mL de Bradford 5X dilué (Biorad, Hercules) ; 3µL de chaque échantillon sont déposés dans 1mL de Bradford 5X dilué. Ensuite, 200µL de ce mélange sont déposés en triplicats dans une plaque 96 puits et l'absorbance est lue à 595nm à l'aide du spectrophotomètre FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH).

Electrophorèse et transfert sur membrane : Dans un gel en gradient (4-15%) de polyacrylamide, 20µg de protéines en présence de bleu de charge sont déposés à l'intérieur des puits et 5µL de marqueur de poids moléculaire sont déposés dans un puits. Le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TGS 10X dilué (Tris Glycerin SDS buffer, Bio-Rad) et un courant de 200V, 400mA est appliqué ce qui permet la migration des protéines. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) (Bio-Rad) grâce à l'application d'un courant électrique pendant 7 min à l'aide de l'appareil Trans-Blot Turbo (Bio-Rad).

Immunodétection : La membrane est bloquée dans du T-TBS-lait 5% (TBS et Tween 20% dans du lait 5%) pendant 1h à température ambiante sous agitation, afin de saturer les sites de liaison aspécifiques des anticorps utilisés par la suite. Puis, l'anticorps primaire est dilué dans du T-TBS-lait 5% ou de la BSA 3%, et placé au contact de la membrane pendant une nuit à 4°C sous agitation. La membrane est rincée avec du T-TBS 1X et l'anticorps secondaire, dilué dans du T-TBS-lait, est déposé sur celle-ci. Après 1h à température ambiante sous agitation, la membrane est rincée avec du T-TBS 1X, puis avec du TBS 1X pour retirer le Tween, un détergent. Les complexes immuns sont révélés grâce à une solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence). La détection de la chemoluminescence est réalisée par un imageur (Image Quant LAS 4000).

Les anticorps utilisés pour Mcl-1, LC3, mTOR (ser2448), P-p70S6K, p70S6K, P-4E-BP1, 4E-BP1, PARP, proviennent de Cell Signaling Technology, Ozyme (Saint Quentin en Yvelines). L'actine provient de Calbiochem (Millipore, Molsheim, France) et Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). p62

(SQSTM1) provient de chez Abnova (Taipei, Taiwan), Bcl-2 provient de Dako (Santa Clara, USA), p-PDH (Ser 293) provient de Novus Biologicals (Southpark Way, USA).

## **7. Microscopie électronique à transmission**

Pour la microscopie électronique à transmission, les cellules ont été fixées avec de la glutaraldéhyde 2,5% dans du PBS 1X, incluses en agar, post-fixées dans du tetroxide d'osmium 1% préparé dans du tampon Sorensen, déshydratées dans de l'éthanol puis incluses en résine EPON. Des coupes ultrafines ont ensuite été réalisées et colorées avec de l'acétate d'uralyl et du citrate de plomb puis examinées sous un microscope JEOL1011.

## **8. Oxygraphie**

Le but de cette expérience est de mesurer la consommation d'oxygène dans les cellules perméabilisées. Une électrode à oxygène est composée d'une cathode de platine et d'une anode en argent qui sont reliées par une solution de KCl. Ce montage est séparé de la chambre contenant la suspension cellulaire par une membrane en téflon qui ne laisse passer que l'oxygène. Lorsqu'une tension de 0,7 V est appliquée au niveau de l'électrode, l'oxygène est réduit en eau au niveau de la cathode puis donne  $4H^+$  et  $4HO^-$ . A l'anode, l'argent du KCl dissocié donne alors 4 électrons, ce qui permet de produire un courant électrique proportionnel à la concentration en oxygène dans la chambre de mesure. Ce courant est ensuite amplifié et analysable par le logiciel auquel est liée l'appareil de mesure.

La consommation a été mesurée grâce à l'oxygraphe Oxytherm, SystemHansatech instrument (UK). Les cellules ont été traitées puis décollées de la boîte de culture avec de la trypsine, comme expliqué précédemment. Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans du tampon de respiration complet (100mM KMES, 5mM  $KH_2PO_4$ , 1mM EGTA, 3mM EDTA, 1mg/ml BSA and 2mM ADP) à 37°C puis les cellules ont été perméabilisées avec de la digitonine (0,02%). Cent cinquante  $\mu$ l de suspension cellulaire sont transférés dans la chambre oxygraphique avec 250  $\mu$ l de tampon de respiration, sous agitation continue afin d'homogénéiser la concentration d'oxygène. La respiration mitochondriale des complexes II, III et IV est évaluée pendant 15 minutes dans la première chambre grâce à l'ajout de la roténone (0,2 mM) pour inhiber le complexe I et de succinate (23,04 mM) pour permettre d'induire l'activité du complexe II. La deuxième chambre évalue les capacités de la chaîne respiratoire en totalité grâce à l'ajout de ses substrats : le pyruvate (9,48 mM) et le malate (4,74 mM). Les mesures de la concentration en oxygène dans la chambre est déterminée par le logiciel (Oxygraph plus).

La consommation en oxygène est alors rapportée au volume dans la cuve et à la quantité de protéines après dosage colorimétrique par la méthode de Bradford.

## Résultats :

*Le CAI possède un effet cytostatique et provoque une mort des cellules cancéreuses ovariennes pour de fortes doses*

Les lignées cellulaires IGROV1-R10, SKOV3 et OVCAR3 ont été traitées par 5 et 10  $\mu\text{M}$  de CAI pendant 24h, 48h et 72h.

Les courbes de croissance montrent que le CAI 5  $\mu\text{M}$  est cytostatique pour les 3 lignées cellulaires mais qu'il devient cytotoxique pour les IGROV1-R10 à 72h. En ce qui concerne la dose 10  $\mu\text{M}$ , elle apparaît cytotoxique pour les IGROV1-R10 à 48h et pour les 3 lignées à 72h (Figure 1B).

L'analyse en cytométrie de flux montre que le CAI n'a pas d'effet majeur sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Cependant, il est possible d'observer une augmentation du pic sub-G1 pour la condition 5  $\mu\text{M}$  de CAI à 72h pour les IGROV1-R10 mais cet effet n'est pas retrouvé pour la dose 10  $\mu\text{M}$ . En ce qui concerne les OVCAR3, les pics sub-G1 à 5 et 10  $\mu\text{M}$  atteignent 25%, cependant celui du DMSO est à 18%, révélant une mort basale non négligeable (Figure 1A). Par ailleurs, la mort observée ne s'accompagne pas du clivage de la PARP (Figure 1C) ; des phénomènes apoptotiques ne semblent pas impliqués.

L'observation au microscope optique à l'objectif x10 en contraste de phase a mis en évidence qu'un changement morphologique important apparaît pour la lignée IGROV1-R10 dès 48h de traitement par 5  $\mu\text{M}$  de CAI. En effet dans cette condition, la cellule prend une forme contournée, des vacuoles apparaissent au sein d'un cytoplasme qui a tendance à se rétracter. De plus, les traitements prolongés (72h à 5  $\mu\text{M}$  de CAI) ou à des doses plus fortes (48h à 10  $\mu\text{M}$  de CAI) induisent leur mort. Cette mort se caractérise morphologiquement par un décollement des cellules en plaques (Figure 2 - planche IGROV1-R10 - A).

Afin d'obtenir une meilleure visualisation des changements morphologiques de ces cellules, une observation par microscopie électronique à transmission (collaboration avec le Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie de la SF ICORE de l'Université de Caen Normandie) a été effectuée sur ces cellules traitées 24h 48h et 72h par 5  $\mu\text{M}$  de CAI. La figure 2 (Planche IGROV1-R10 - B) montre que pour les conditions contrôles (DMSO), les cellules, quel que soit le temps de traitement, présentent des filopodes, un noyau bien délimité contenant de la chromatine et des nucléoles.

En présence de CAI, les IGROV1-R10 présentent un changement d'ultrastructure important à partir de 48h de traitement. Ce changement se caractérise par la présence de très nombreuses vacuoles qui semblent vides ou, pour certaines, qui contiennent des morceaux de membranes. La chromatine apparaît plus condensée et on observe une très grosse vacuole contiguë au noyau. A 72h de

traitement, la membrane plasmique est rompue par endroit libérant le matériel cytoplasmique et la vacuole proche du cytoplasme présente un volume plus important.

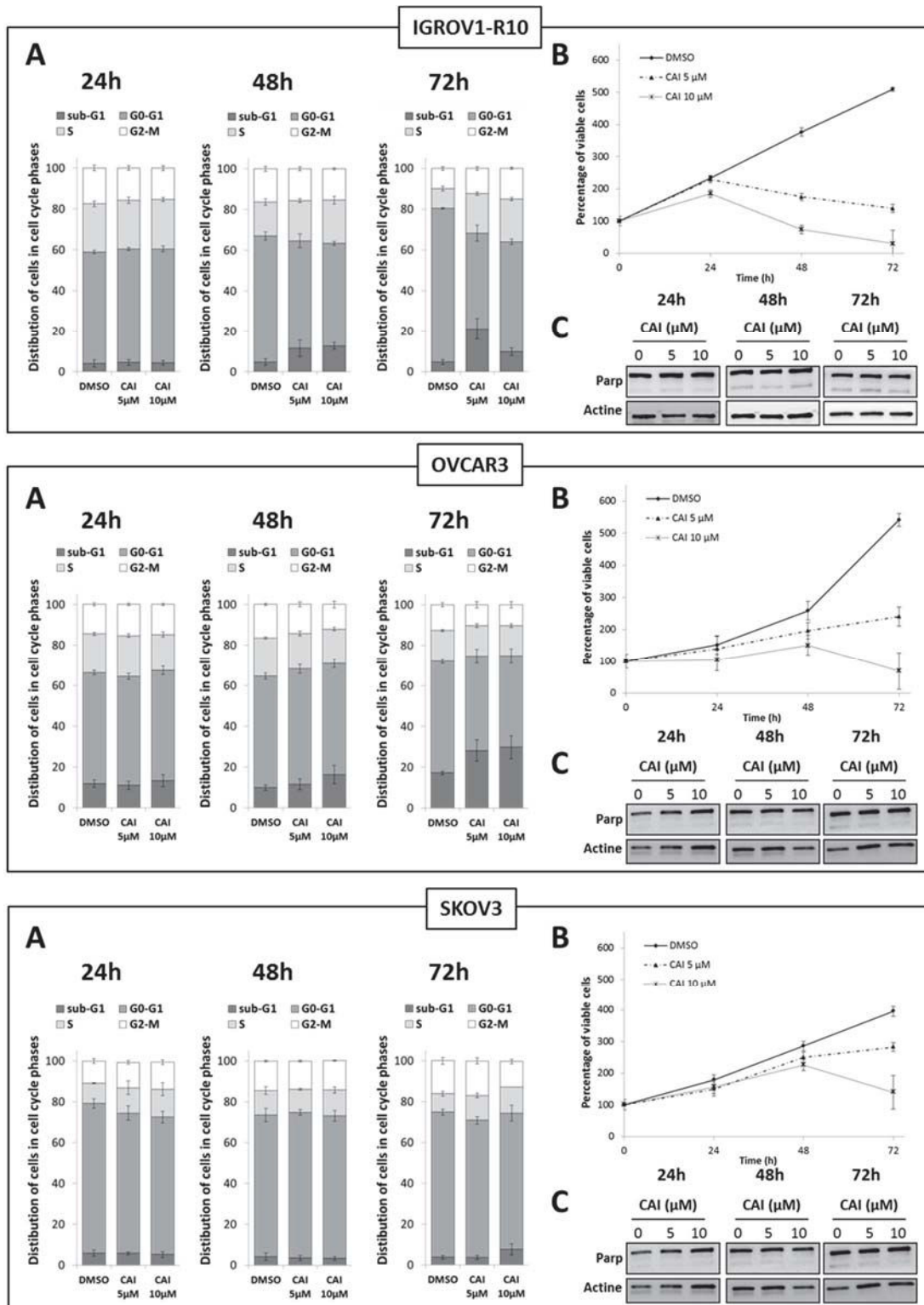


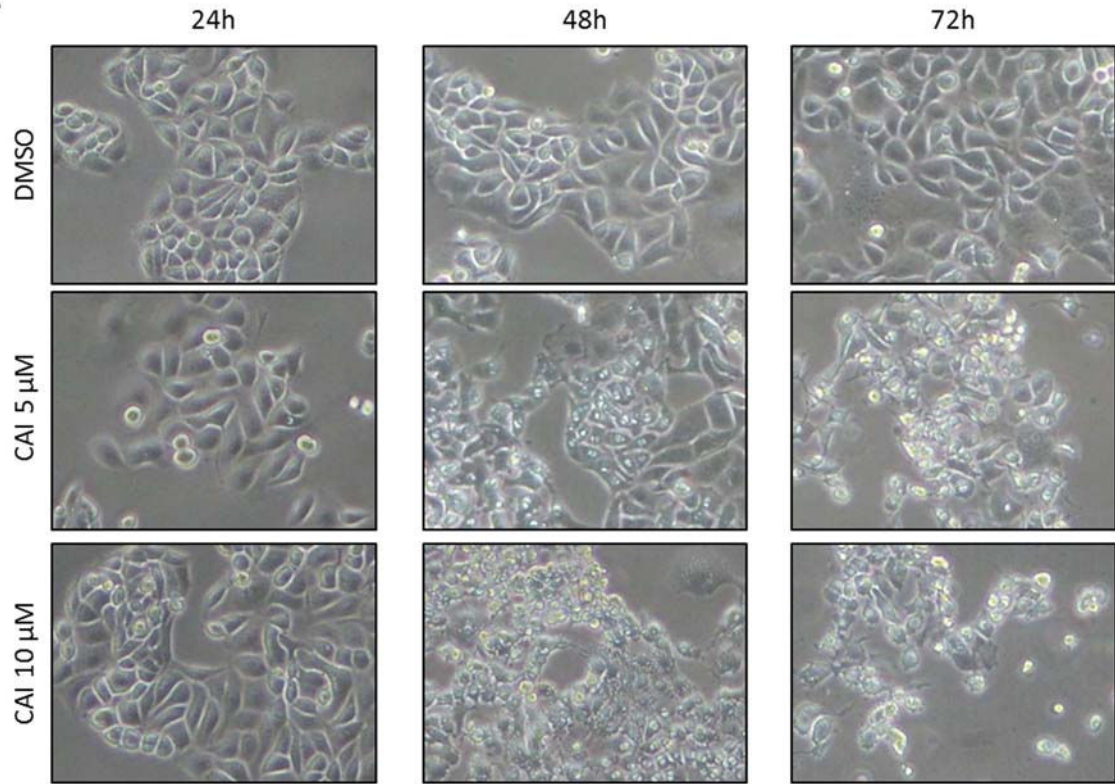
Figure 1 : Etude de l'effet du CAI sur la prolifération et la viabilité cellulaire.

Les cellules IGROV1-R10, OVCAR3 et SKOV3 ont été traitées pendant 24h, 48h et 72h par du CAI à 5 et 10  $\mu$ M. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

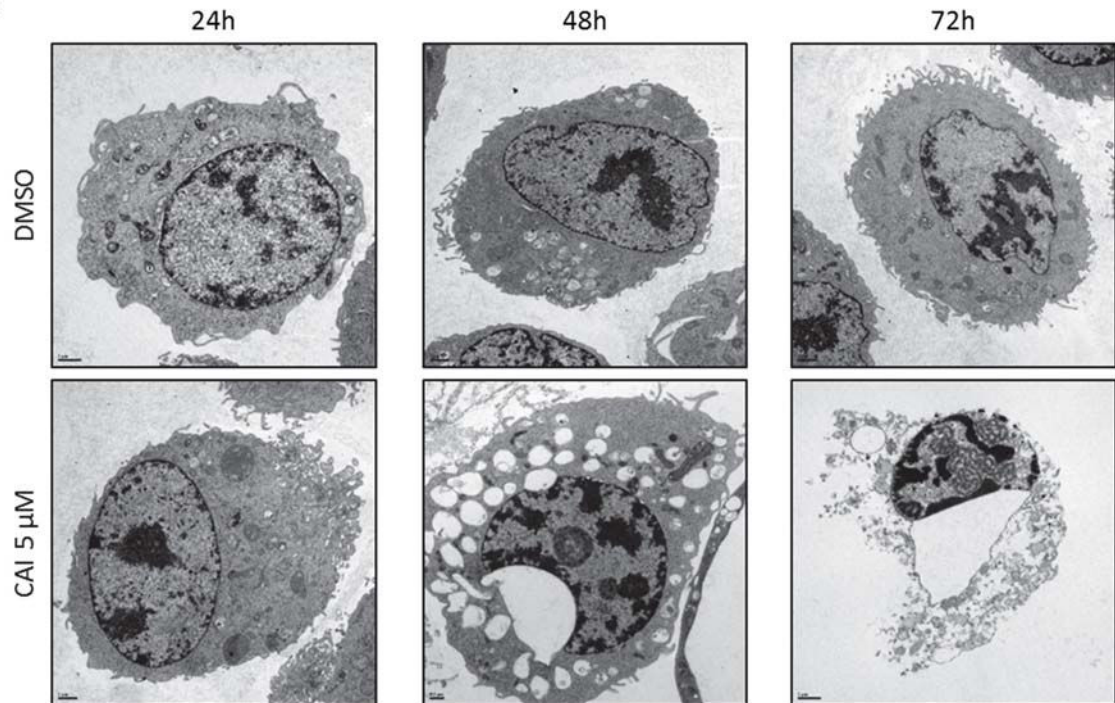
En ce qui concerne les cellules SKOV3 et OVCAR3 observées en microscopie optique, le traitement par le CAI induit également une modification de la forme de la cellule, le cytoplasme a également tendance à se rétracter mais aucune vacuole n'est visible quels que soient la dose et le temps de traitement et ceci même pour des traitements plus longs (96h non montrés ici) (Figure 2 - planche OVCAR3 et SKOV3 - A). L'analyse par microscopie électronique à transmission montre que le cytoplasme des OVCAR3 apparaît homogène avec une présence plus marquée de vacuoles de phagocytose contenant du matériel cellulaire que dans les conditions témoins. Dans les conditions traitées par le CAI, les SKOV3 et les OVCAR3 présentent peu de changements de leurs ultrastructures, excepté une diminution du nombre de filopodes de certaines cellules SKOV3 après 72h de traitement (Figure 2 - planche OVCAR3 et SKOV3 - B).

# IGROV1-R10

**A**



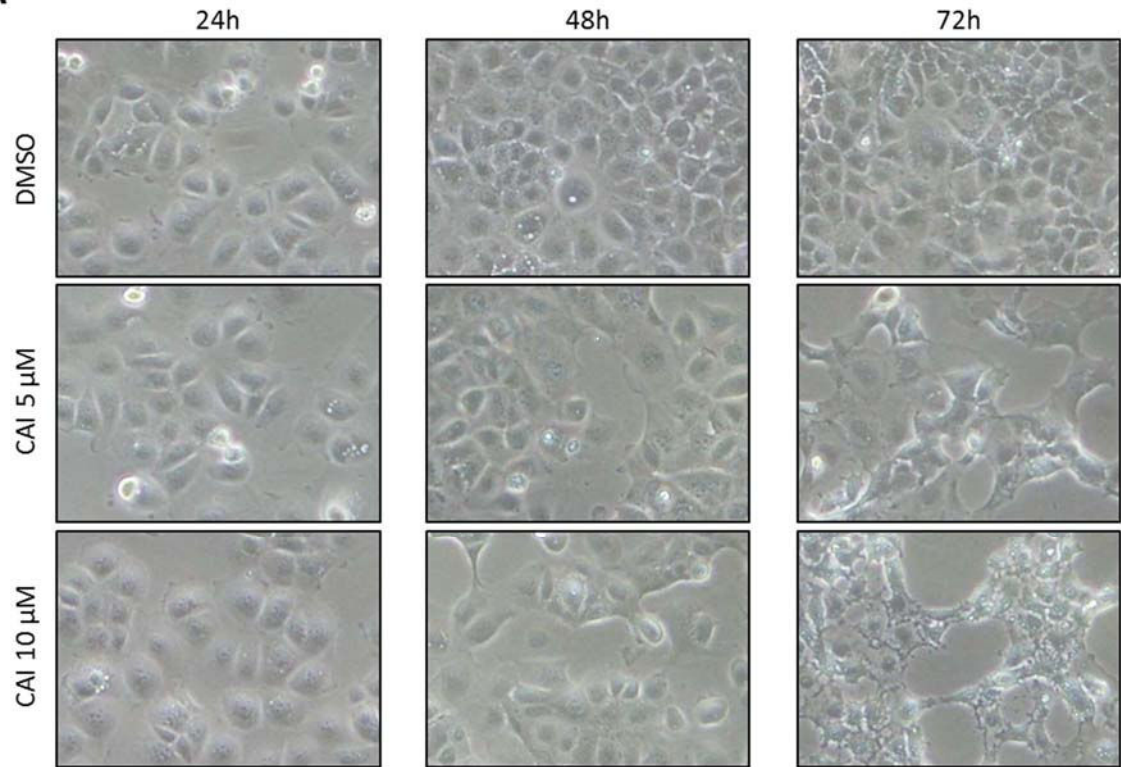
**B**



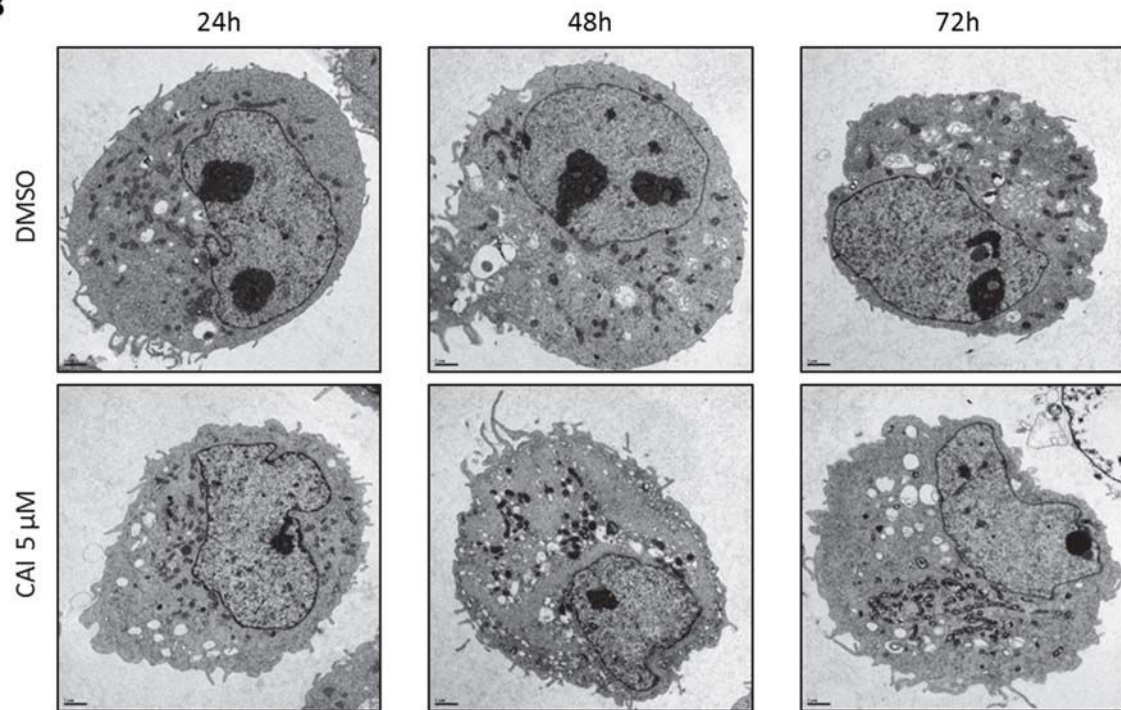


# OVCAR3

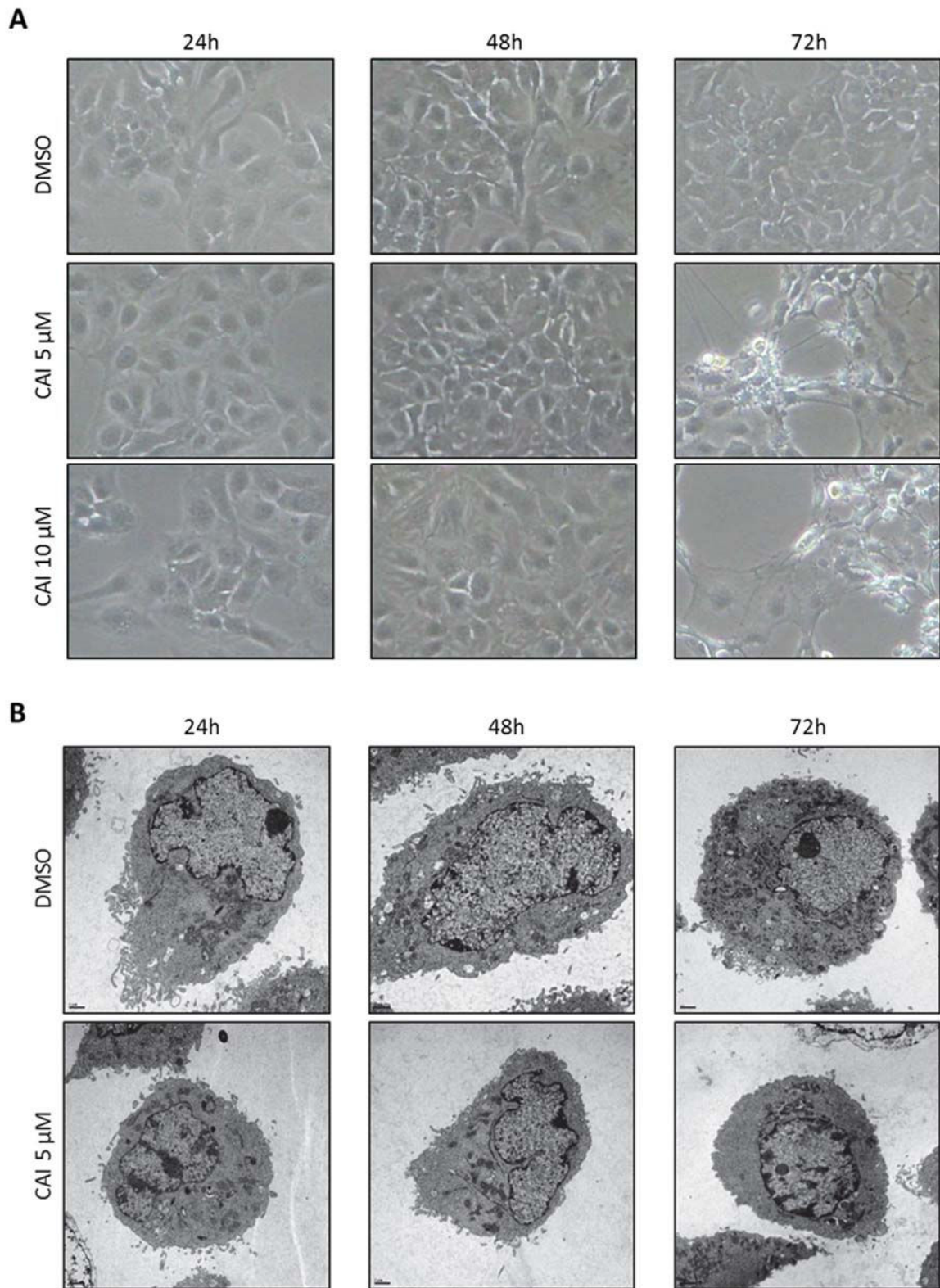
**A**



**B**



## SKOV3



**Figure 2 : Effet du CAI sur la morphologie des cellules IGROV1-R10, OVCAR3 et SKOV3.**

Les lignées cellulaires ont été traitées au CAI pendant 24h, 48h et 72h. A- Leur morphologie a été appréciée par microscopie optique à contraste de phase (x 10). B- Leur ultrastructure a été appréciée par microscopie électronique à transmission.

## *L'autosis, un nouveau type de mort induit par l'autophagie dans des conditions hypoxiques*

### Etude de la morphologie

Les observations qui précèdent ne sont pas sans rappeler un type de mort récemment décrit dans la littérature : l'autosis, mort cellulaire induite par l'autophagie et la privation en nutriments dans des conditions hypoxiques (Liu et al., 2013). Dans cette étude, les processus autophagiques ont été induits par la transfection d'un peptide Tat-Becline-1 dans la lignée cellulaire cancéreuse Hela. Ce peptide est composé de 11 acides aminés de la protéine Tat du virus HIV et de 18 acides aminés de la protéine Beclin-1. Utilisé à faibles doses, ce peptide induit une autophagie non cytotoxique. Au contraire, utilisé à fortes doses, il induit une mort cellulaire. Bien que l'autophagie soit reconnue comme essentielle pour le maintien de l'homéostasie lors de conditions de stress cellulaire, dans certaines circonstances, elle peut cependant conduire à la mort.

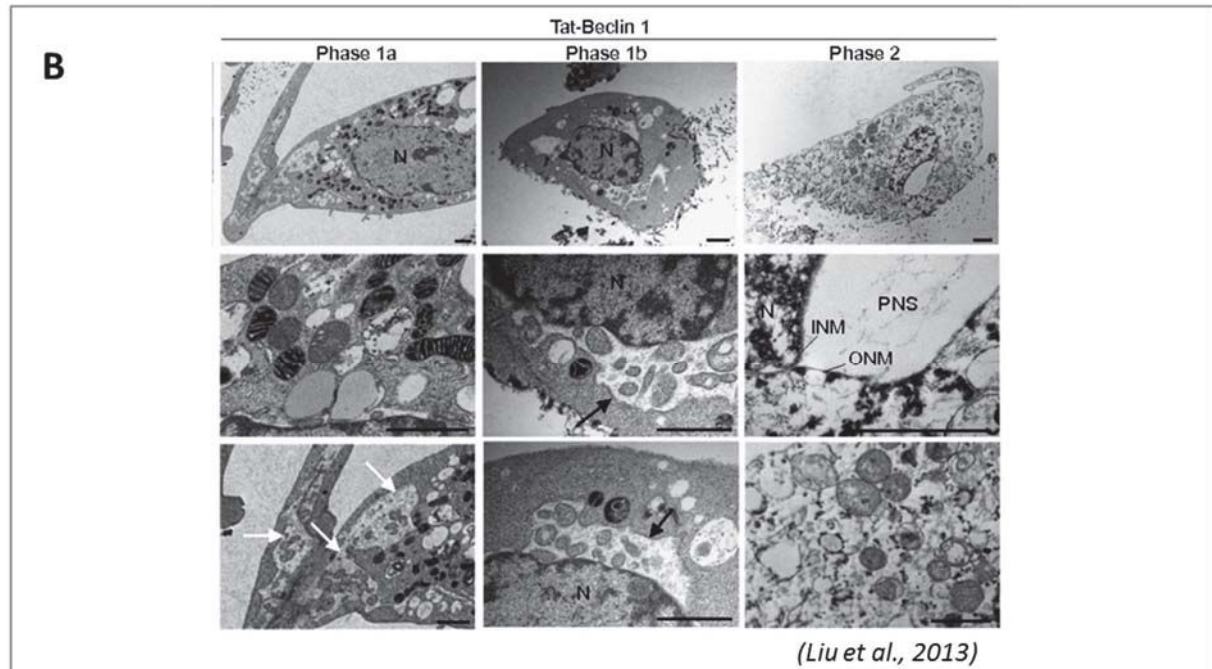
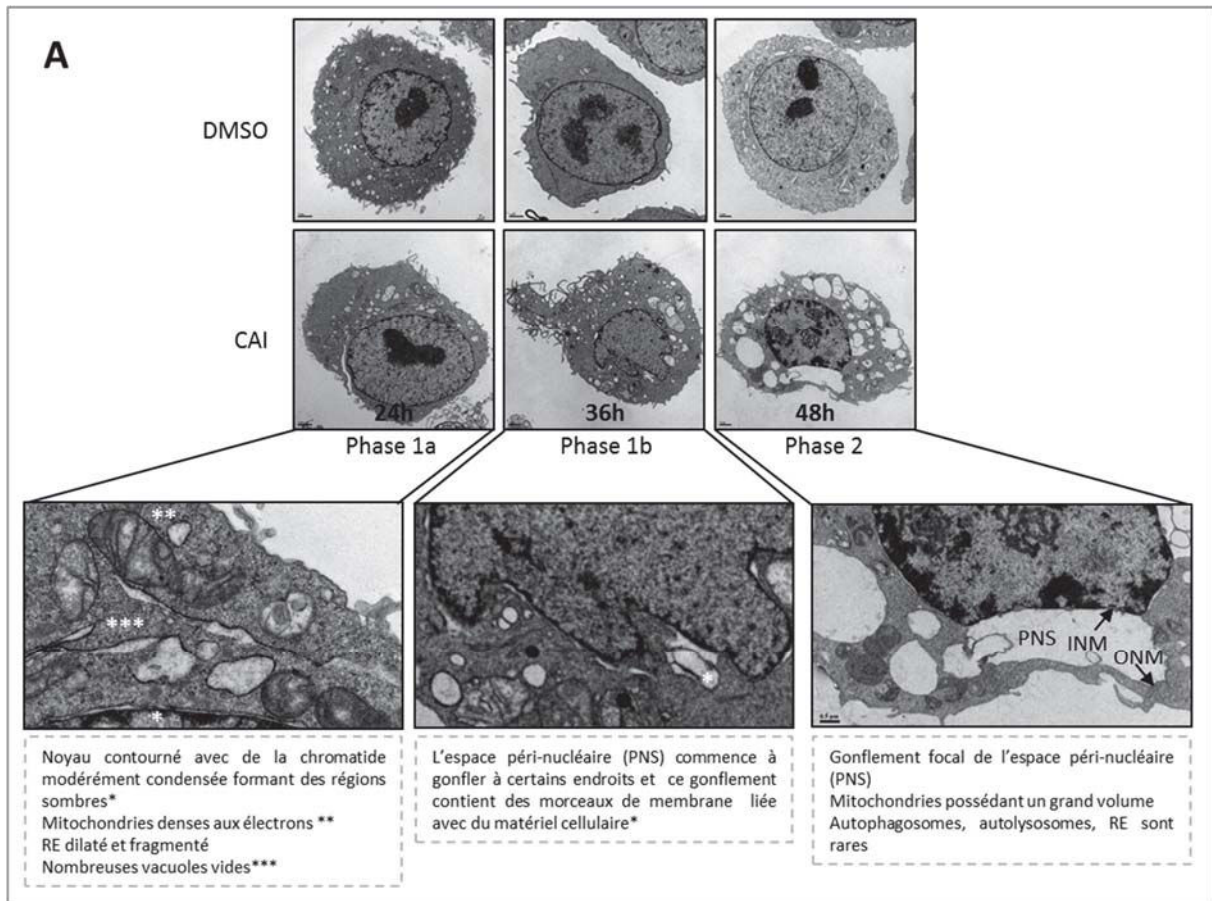
L'étude précise du déroulement de l'autosis a permis de mettre en évidence 3 étapes successives : Les phases 1A et 1B se caractérisent par une cinétique lente et des changements graduels. La phase 2 est beaucoup plus rapide et conduit à la mort des cellules.

*La phase 1A* : le noyau a une enveloppe contournée, la chromatide est modérément condensée formant des régions sombres, les mitochondries sont denses aux électrons. Par ailleurs, de nombreux autolysosomes, autophagosomes et vacuoles vides sont présents.

*La phase 1B* : L'espace péri-nucléaire commence à gonfler à certains endroits et contient des morceaux de membranes et du matériel cellulaire.

*La phase 2* : se caractérise par un gonflement focal de l'espace péri-nucléaire qui apparaît vide. La surface nucléaire devient concave et les autophagosomes, autolysosomes ainsi que le RE sont rares. Lors de cette phase, les cellules adhèrent fortement à leur substrat jusqu'à la lyse de la membrane plasmique et leur mort.

Une étude sur un laps de temps plus restreint en microscopie électronique a été réalisée afin de vérifier que les changements morphologiques observés dans la lignée IGROV1-R10 pouvaient se rapprocher de ceux observés dans l'autosis. Cette étude a permis de retrouver les différentes phases précédemment décrites et met en lumière l'apparition de cet espace péri-nucléaire caractéristique de l'autosis (Figure 3).



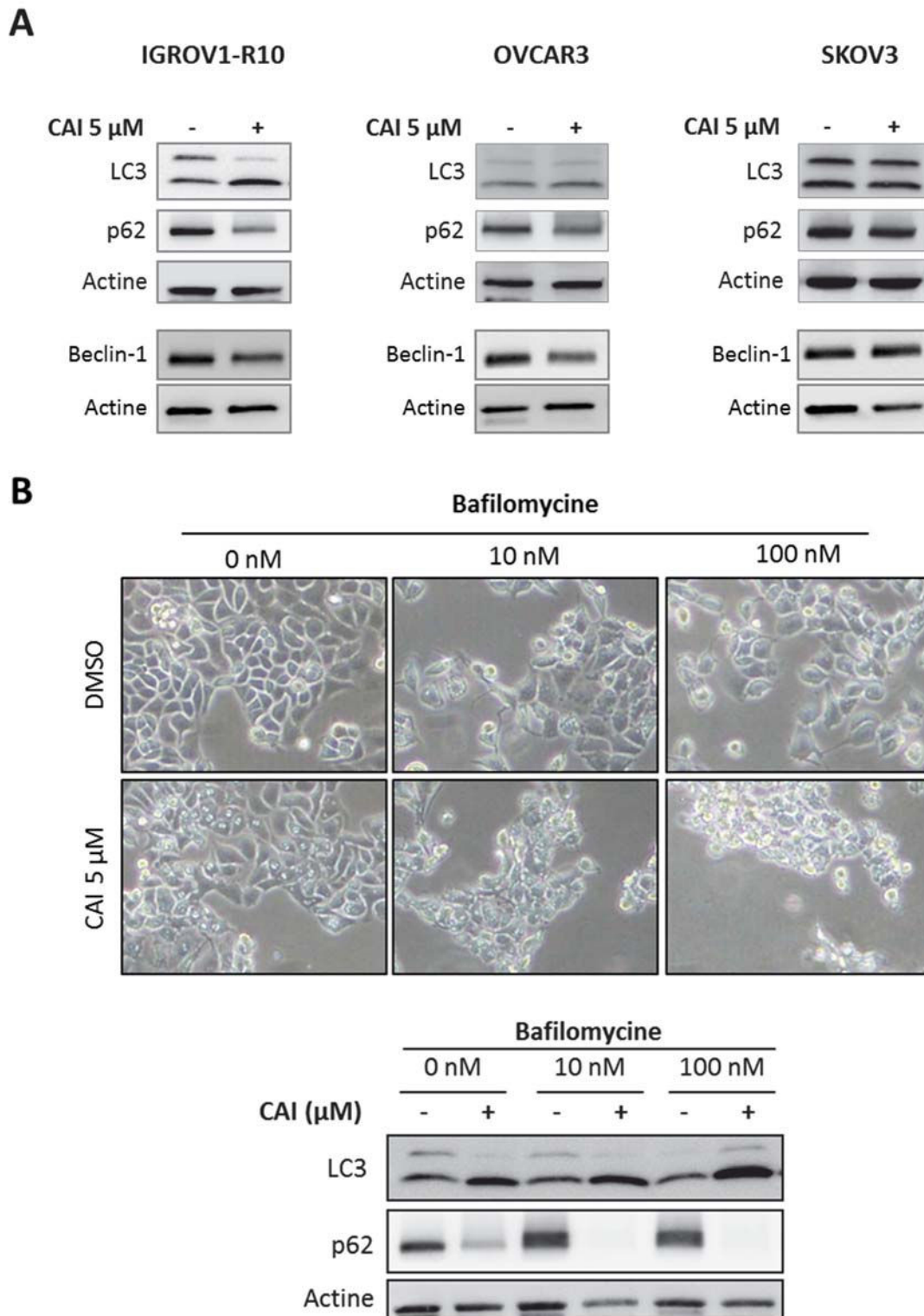
**Figure 3 : Morphologie des cellules IGROV1-R10, en microscopie électronique à transmission et étude comparative avec les résultats obtenus dans l'article princeps décrivant l'autosis.**

Les cellules ont été traitées au CAI pendant 24h, 36h et 72h. Leur morphologie a été appréciée par microscopie électronique à transmission. A- Pour chaque temps les caractéristiques des phénomènes d'autosis observées par Liu et al., ont été relevées. B- Résultats en MET de l'article de Liu et al., 2013 montrant les caractéristiques morphologiques de l'autosis sur des Hela transfectées avec le peptide Tat-Becline-1.

Etude moléculaire : l'autosis peut être mise en évidence par des marqueurs de l'autophagie mais ne déclenche ni apoptose ni nécroptose

Sur le plan moléculaire, il n'existe pas de marqueurs biologiques spécifiques de l'autosis mais Liu et Levine ont résumé certaines caractéristiques fondamentales de ce processus dans leur article et leur dernière revue (Liu et al., 2013) (Liu and Levine, 2015). L'autosis est une mort cellulaire dépendante de l'autophagie et peut donc être mise en évidence par les marqueurs classiques de ce processus : la dégradation de p62 (traduisant la dégradation de matériel cellulaire par l'autophagosome) et un passage de la forme LC3-I vers la forme LC3-II (liée à la phosphatidyléthanolamine), forme retrouvée lorsque cette protéine se lie au phagophore. Par ailleurs, cette équipe a montré que cette forme de mort était inhibée par un traitement à la 3-méthyladénine (3-MA), un inhibiteur des PI3K de type III telle Vps34 qui joue un rôle lors de la première étape de l'autophagie. De plus, l'autosis est inhibée par l'inactivation génique des protéines jouant un rôle pivot dans l'autophagie : Becline-1, ATG13, ATG14, mais n'est pas inhibée par la Bafilomycine A1, suggérant que cette forme de mort ne nécessite pas les étapes tardives de l'autophagie.

Nous avons donc tenté de retrouver ces caractéristiques dans notre lignée IGROV1-R10. Nous avons pu montrer que le traitement par le CAI induisait un passage de la forme LC3-I à la forme LC3-II et s'accompagnait d'une diminution de l'expression de p62. En ce qui concerne les OVCAR3 et les SKOV3 seule une légère diminution de p62 est observable, suggérant que l'autosis ne semble pas impliquée (Figure 4A). L'expression de la protéine Becline-1 n'est modulée dans aucune des lignées. Par ailleurs, la Bafilomycine A1 ne reverse ni la morphologie, ni le passage de LC3-I à LC3-II induits par le CAI dans les IGROV1-R10 (Figure 4B).



**Figure 4 : Le CAI induit les marqueurs classiques de l'autophagie dans les cellules IGROV1-R10.**

A- Les lignées cellulaires IGROV1-R10, OVCAR3 et SKOV3 ont été traitées par du CAI 5  $\mu$ M pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3). L'expression des marqueurs classiques de l'autophagie : LC3, p62 et Beclin-1 ont été analysés par western blot. B- Effet de la Bafilomycine sur les phénomènes d'autophagie induits par le CAI. Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées 48h par 5  $\mu$ M de CAI en absence ou en présence de Bafilomycine (10 et 100 nM). La morphologie des cellules a été appréciée par microscopie optique à contraste de phase et l'expression de LC3 et de p62 ont été analysées par western blot.

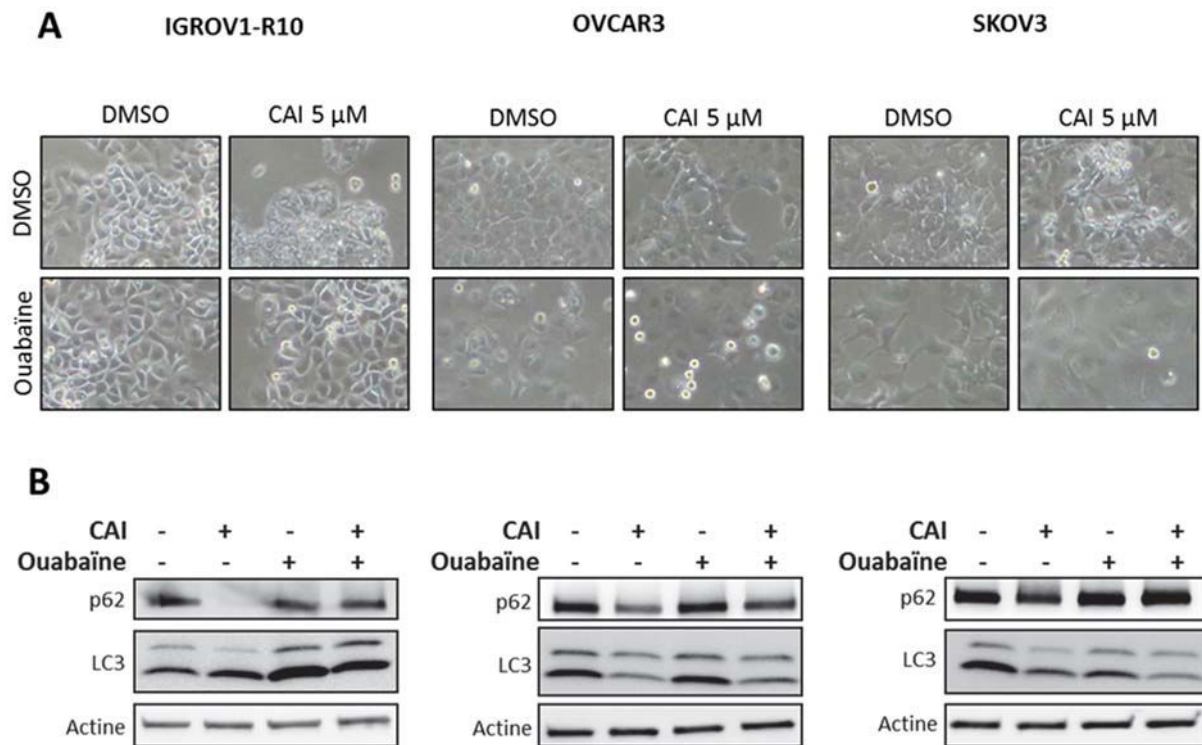
L'autosis peut être abolie par l'inhibition pharmacologique ou génique de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase.

Afin de mieux comprendre la régulation de l'autosis, des inhibiteurs de ce phénomène ont été recherchés et un screening de 5000 molécules a été réalisé par Liu *et al.*. Il en est ressorti que cette mort était contrecarrée par les glycosides cardiotoniques (ou digitaliques) tels la digoxine ou la ouabaïne. Ces molécules agissent au niveau cellulaire comme inhibiteurs de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase. Lorsqu'elle fonctionne, cette pompe réalise la sortie de trois ions sodium dans le milieu extracellulaire et l'entrée de deux ions potassium dans le cytoplasme, maintenant ainsi le potentiel électrochimique de la membrane. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase est un tétramère formé de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  constitue le domaine de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, assure le transport ionique et fixe les digitaliques. La sous-unité  $\beta$  correspond au domaine de liaison à la ouabaïne, glycoside digitalique. Une troisième sous-unité  $\gamma$  a également été décrite mais sa présence n'est pas indispensable au fonctionnement de la pompe et son rôle est encore mal connu. Il existe 4 isoformes de la sous-unité  $\alpha$  et 3 de la sous-unité  $\beta$ .

Nous avons donc testé sur nos 3 lignées cellulaires l'effet de la ouabaïne en présence de CAI pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3).

L'observation de la morphologie des IGROV1-R10 révèle que cette molécule contrecarre totalement les effets du CAI. Ainsi, lors du co-traitement, les cellules arborent une forme ressemblant à celle observée dans les conditions témoins et aucune vacuole n'est observée dans le cytoplasme des cellules IGROV1-R10 (Figure 5A). Par ailleurs, cet inhibiteur restaure l'expression de p62 et de la forme I de la protéine LC3 dans ces cellules (Figure 5B). En ce qui concerne les OVCAR3, elles semblent sensibles à l'action de la ouabaïne, cependant nous n'observons plus les changements caractéristiques observés après traitement par le CAI. Dans les cellules SKOV3, bien que les changements morphologiques observés avec le CAI ne ressemblent pas à de l'autosis, le traitement avec la ouabaïne leur permet de retrouver une morphologie identique à celle observée dans les conditions contrôles (Figure 5A). Par ailleurs, le CAI ne module pas de façon nette p62 et LC3 dans les SKOV3 et tend à légèrement les diminuer dans les OVCAR3. La ouabaïne n'a pas d'action nette sur les effets du CAI dans ces cellules (Figure 5B).

Nous pouvons donc avancer que le CAI induit des phénomènes ressemblant à l'autosis dans les cellules IGROV1-R10 mais pas dans les OVCAR3 ni dans les SKOV3.



**Figure 5 : La ouabaïne, un inhibiteur de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase contrebalance l'autosis induite par le CAI dans la lignée IGROV1-R10.**

Les lignées cellulaires ont été traitées par du CAI 5  $\mu$ M pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3) en présence ou non de ouabaïne (150 nM pour IGROV1-R10, 75 nM pour OVCAR3 et 100 nM pour SKOV3). A- La morphologie des cellules a été appréciée par microscopie optique à contraste de phase. B- l'expression de LC3 et de p62 ont été analysées par western blot.



### Le CAI induit une perturbation de la respiration mitochondriale

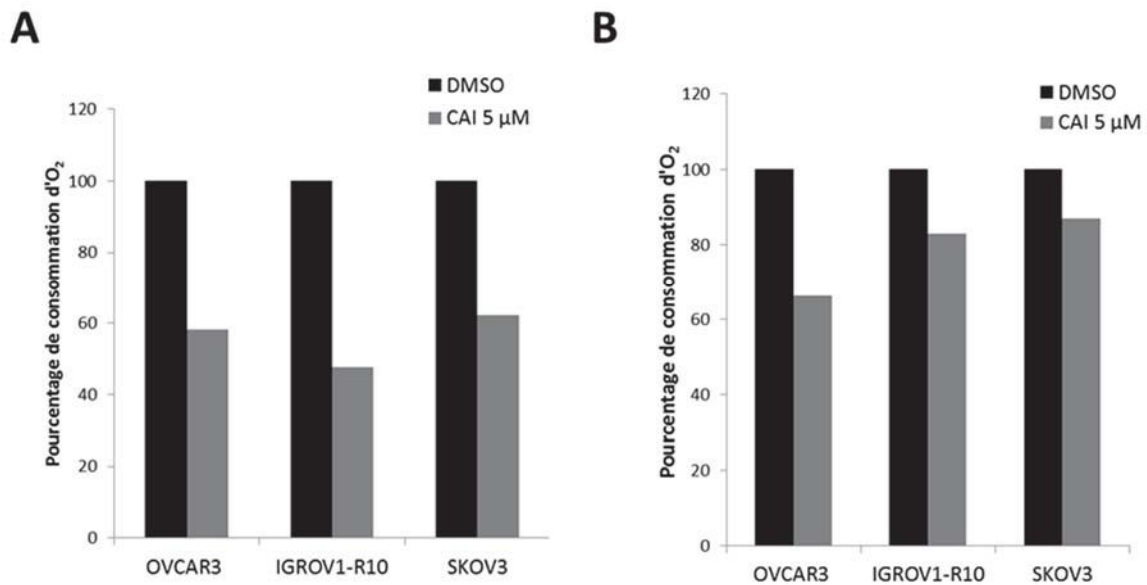
Dans leur article, Liu *et al.*, ont également montré que l'autosis était induite lorsque les cellules Hela étaient incubées dans un milieu sans nutriment (Liu et al., 2013). Par ailleurs, cette mort est également observable *in vivo* au niveau du cerveau de rat ayant subi des lésions d'ischémie/hypoxie. De plus, une autre étude a montré que des phénomènes d'autosis étaient observables lors d'un maintien de lignées cellulaires dans des conditions hypoxiques: l'autosis se définirait donc comme une autophagie en conditions hypoxiques (Chen et al., 2016). Il serait alors possible d'avancer que le CAI perturbe le métabolisme de la cellule cancéreuse en mimant des conditions d'hypoxie cellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la consommation d'oxygène des IGROV1-R10 en présence ou non de CAI. Cette étape a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier et Universitaire de Caen (Pr. S. Allouche). Ainsi, les cellules ont été traitées 48h en présence ou non de CAI 5 $\mu$ M et la consommation d'oxygène a été mesurée par oxygraphie. Pour chaque condition de traitement, l'effet des composés sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale a été testé soit sur l'ensemble des complexes formant cette chaîne (Figure 6A), soit sur tous les complexes excepté le complexe 1 (par ajout d'un inhibiteur du complexe 1, la roténone) (Figure 6B). De ce fait, si le composé testé est un inhibiteur du complexe 1, une inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> sera observable dans le premier cas, tandis qu'aucune variation de consommation ne sera détectée dans le second cas. Si le produit testé inhibe un autre complexe (II, III, IV), une diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> sera observable dans les 2 cas.

Les résultats obtenus sur les IGROV1-R10 et les SKOV3 ont mis en évidence que le CAI induisait une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale d'environ 50% et 40% respectivement (Figure 6A). Cette inhibition semble être majoritairement liée à une diminution de l'activité du complexe I puisque le CAI n'entraîne qu'une faible diminution de la consommation en oxygène lorsque l'on teste l'activité des complexes II, III, IV (-17% et -14% respectivement en moyenne) (Figure 6A). Pour les OVCAR3, une baisse d'environ 40% est visible dans les 2 cas, suggérant que le CAI agit sur un autre complexe que le complexe I. En conclusion, le CAI semble inhiber la respiration mitochondriale dans les 3 lignées cellulaires mais agirait plus spécifiquement sur le complexe I dans les lignées IGROV1-R10 et SKOV3.

D'autres arguments viennent étayer ce résultat. En effet, nous avons observé que le traitement par le CAI induisait une acidification du milieu de culture de nos cellules, phénomène reflété par un changement de couleur de l'indicateur coloré, le rouge de phénol. Ainsi la mesure du pH du milieu

cellulaire passe de 7,32 à 7,02 soit une diminution de 0.3 unité pH. Cette acidification peut être la conséquence d'un relargage de substances telles que le lactate, effet observé lors d'une perturbation



**Figure 6 : Effet du CAI sur la respiration mitochondriale. Les lignées cellulaires ont été traitées ou non par du CAI 5 µM pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3).**

A- L'activité de l'ensemble de complexes constituant la respiration mitochondriale a été évaluée après traitement au CAI et a été rapportée à celle obtenue dans les conditions contrôle (DMSO : 100%). B- L'activité de la chaîne respiratoire sans le complexe I (par ajout de l'inhibiteur roténone) a été évaluée après traitement au CAI et a été rapportée à celle obtenue dans les conditions contrôle (DMSO : 100%). C- Effet du CAI sur l'expression de la phospho-pyruvate déshydrogénase (p-PDH). Les lignées cellulaires ont été traitées ou non par du CAI 5 µM pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3) et l'expression de la p-PDH a été analysée par western blot.

du métabolisme énergétique de la cellule. Nous avons donc tenté d'analyser l'effet du CAI sur pyruvate déshydrogénase. Cette enzyme est activée lorsqu'elle est déphosphorylée par la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP) dépendante du calcium. Elle catalyse alors la transformation du pyruvate en acétyl-Coenzyme-A, substrat du cycle de Krebs et permet de ce fait le lien entre le glucose et le cycle de Krebs. Lors d'un déficit en calcium, cette enzyme est inactivée par la pyruvate déshydrogénase kinase. Le pyruvate est alors transformé en lactate grâce à l'action de la lactate déshydrogénase (glycolyse anaérobie).

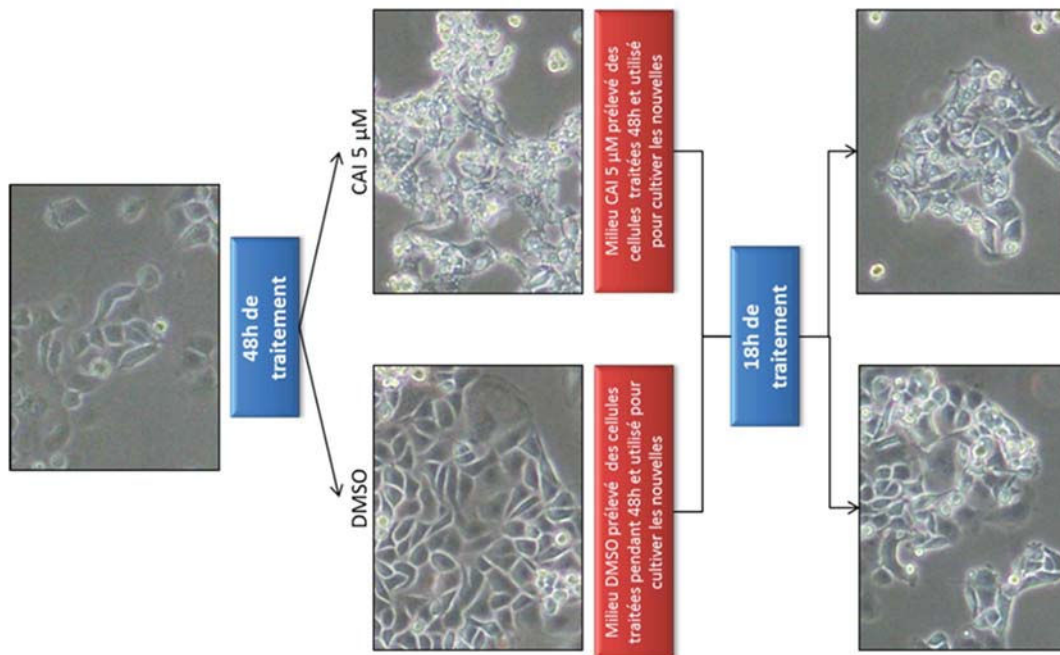
Les résultats préliminaires que nous avons obtenus par western blot ont mis en évidence que le CAI induit une augmentation de la forme phosphorylée inactive de la pyruvate déshydrogénase dans les 3 lignées. Cette inhibition favoriserait la transformation du pyruvate en lactate, ce qui pourrait expliquer l'acidification du milieu de culture après traitement des cellules par le CAI. Les résultats sur la p-PDH représentent une seule expérience et nécessiteront d'être réitérés. L'ensemble de ces arguments suggèrent que le CAI perturbe le métabolisme énergétique en inhibant la respiration mitochondriale et en favorisant la production de lactate.

L'hypothèse du rôle du lactate et de l'acidification du milieu nous a conduit à analyser l'impact de notre milieu de culture sur l'induction de l'autosis par le CAI.

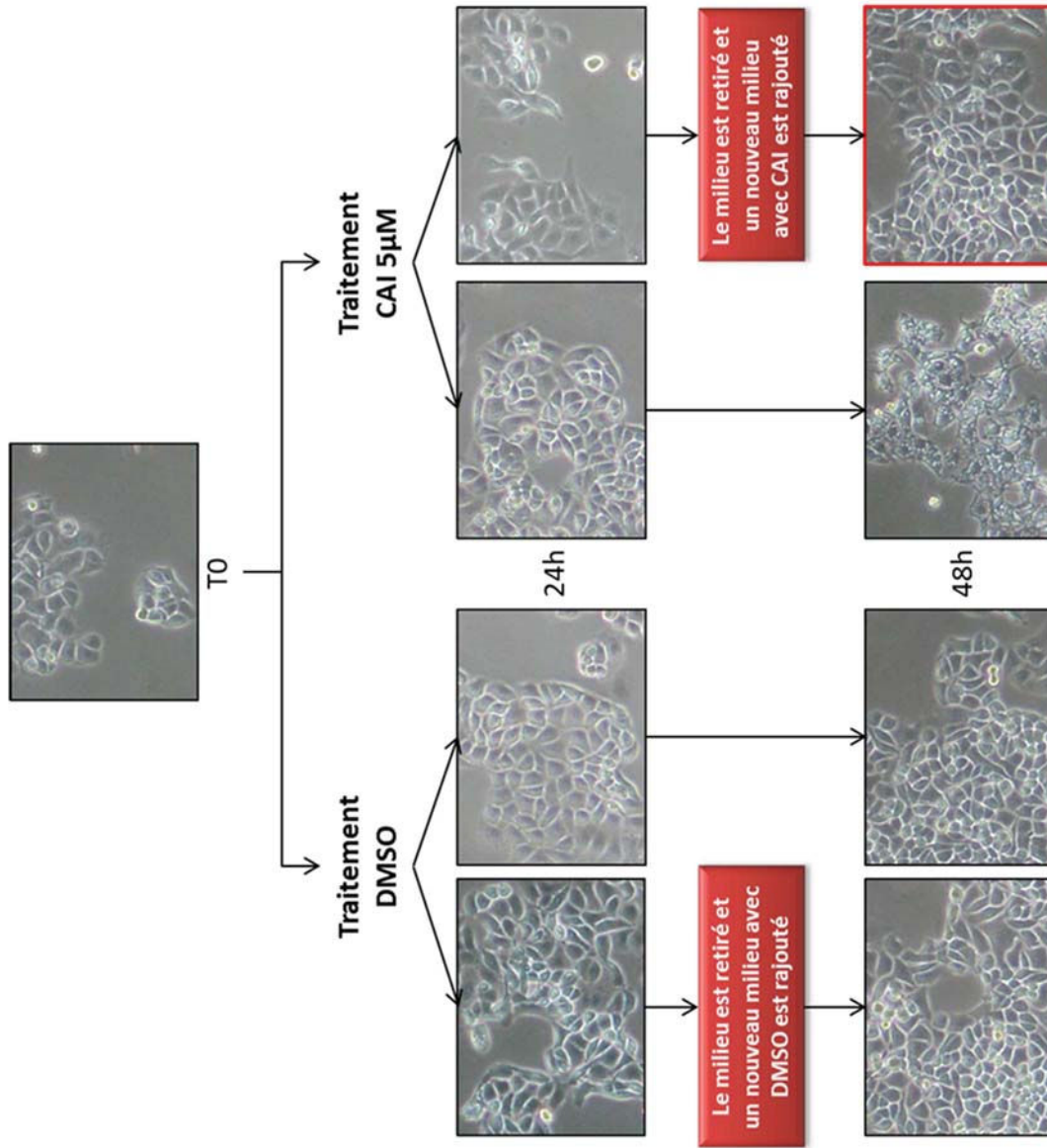
Pour cela, nous avons réalisé des expériences utilisant du milieu conditionné. Ainsi dans une première expérience (Figure 7 – Expérience 1), nous avons traité les cellules IGROV1-R10 pendant 48h avec du DMSO ou du CAI 5  $\mu$ M. Une observation par microscopie optique montre que les cellules présentent des vacuoles et que les phénomènes d'autosis ont bien débuté. Le milieu de ces 2 boîtes a été prélevé et a servi à traiter de nouvelles cellules. L'observation de ces nouvelles boîtes de culture montre qu'après seulement 18h de traitement, les phénomènes d'autosis sont déjà visibles. L'utilisation de ce milieu conditionné a donc accéléré les processus d'autosis.

Dans une seconde expérience, les cellules IGROV1-R10 ont été traitées soit par du DMSO soit par du CAI pendant 24h. Puis le milieu a été changé et remplacé par une solution fraîchement préparée de DMSO ou de CAI qui a été mise en contact pendant 24h (Figure 7 Expérience 2). Les résultats obtenus montrent que le fait de changer de milieu au bout de 24h inhibe l'apparition des phénomènes d'autosis. On pourrait formuler l'hypothèse que pH et/ou le manque de nutriment du milieu ont donc une importance capitale pour l'induction de ces phénomènes.

## Expérience 1



## Expérience 2



**Figure 7 : Le milieu de culture conditionné est nécessaire à l'apparition des phénomènes d'autosis dans la lignée cellulaire IGROV1-R10.**  
 Expérience 1 : Le milieu de culture issu de 48h de traitement par le CAI accélère l'apparition des phénomènes d'autosis dans de nouvelles boîtes de culture. Expérience 2 : Le changement de milieu au bout de 24h de traitement par le CAI par un nouveau milieu contenant également du CAI n'entraîne pas de phénomènes d'autosis.

En résumé, nous avons montré que les changements morphologiques induits par le CAI sembleraient être dus à une mort dérivée de l'autophagie : l'autosis. Elle s'accompagne de changements morphologiques profonds, est mise en évidence par les marqueurs classiques de l'autophagie, est contrecarrée par les inhibiteurs de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase et est corrélée à une inhibition de la respiration mitochondriale. Cette mort est bien visible pour la lignée IGROV1-R10 mais ne semble pas être induite dans les lignées SKOV3 et OVCAR3 bien que le CAI perturbe le métabolisme mitochondrial dans ces lignées.

#### *La ré-induction de la voie PI3K/Akt/mTOR par la ouabaïne n'explique pas les phénomènes d'autosis*

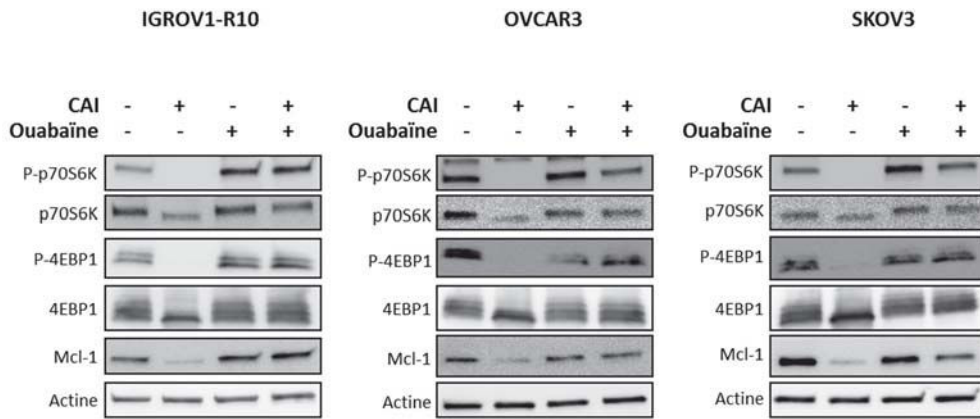
L'autosis étant décrite comme une mort dérivant de l'autophagie, nous avons émis l'hypothèse que la ouabaïne pouvait contrebalancer l'effet du CAI sur mTOR. En effet, la ouabaïne une fois liée à la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase est connue pour activer la kinase src engendrant une activation de nombreuses voies cellulaires telle la voie AKT/mTOR (Liu et al., 2016). Nous avons donc testé si les hétérosides cardiotoniques étaient capables d'entraver l'inhibition de mTOR induite par le CAI dans notre modèle de cellules cancéreuses ovariennes. Pour ce faire, les cellules IGROV1-R10, SKOV3 et OVCAR3 ont été co-traitées par du CAI en présence ou non de ouabaïne.

Les résultats obtenus pour IGROV1-R10 montrent que l'utilisation de ce composé sur-active les cibles de mTORC1 par rapport au DMSO (en particulier pour p- P70S6K) et contrecarre l'effet du CAI sur mTORC1 et ces protéines cibles : p-4E-BP1, p-P70S6K (Figure 8). Cependant, ce composé possède les mêmes effets sur les lignées SKOV3 et OVCAR3 qui ne présentent pas de morphologie d'autosis. Cette activation n'explique donc pas les phénomènes observés dans la lignée IGROV1-R10. Cependant il est intéressant de constater que la ouabaïne contrebalance l'effet du CAI sur Mcl-1.

En résumé, le CAI induit, dans les 3 lignées, une perturbation du métabolisme mitochondrial, une inhibition de mTOR et de ces cibles, effet qui est contrecarré par les inhibiteurs de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase. Cependant, seule la lignée IGROV1-R10 présente les caractéristiques morphologiques et moléculaires de l'autosis comme décrit par l'équipe de Levine.

#### *Le YM58483 induit des changements morphologiques ressemblant à de l'autosis*

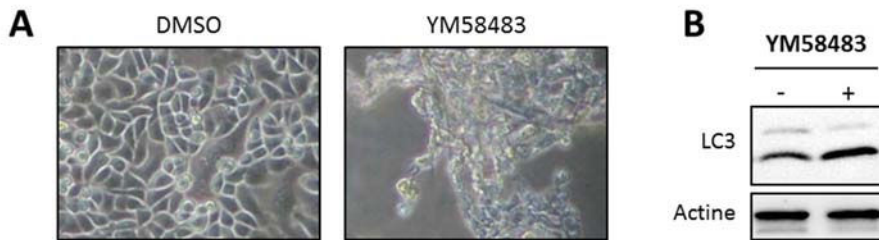
Nous avons par la suite tenté d'élargir l'apparition de l'autosis aux autres inhibiteurs de SOCE. Pour cela, nous avons testé l'effet du YM58483 sur nos cellules et nous avons pu mettre en évidence que ce composé induit, chez les IGROV1-R10, des changements morphologiques qui paraissent similaires à ceux provoqués par le CAI (Figure 9).



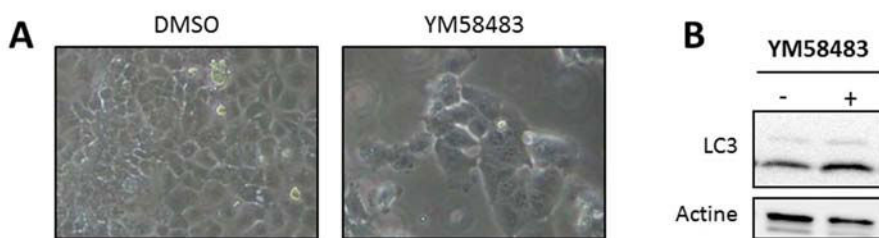
**Figure 8 : La ouabaïne contrebalance l'inhibition de la voie mTOR induite par le CAI mais ce phénomène ne participe pas à l'autosis.**

Les lignées cellulaires ont été traitées par du CAI 5  $\mu$ M pendant 48h (IGROV1-R10) ou 72h (OVCAR3 et SKOV3) en présence ou non de ouabaïne (150 nM pour IGROV1-R10, 75 nM pour OVCAR3 et 100 nM pour SKOV3). L'expression des cibles de mTORC1, p-P70S6K, p70S6K, p-4E-BP1, 4E-BP1 et Mcl-1 a été analysée par western blot.

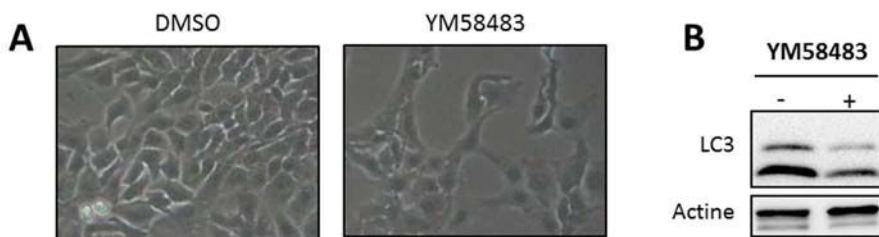
### IGROV1-R10



### OVCAR3



### SKOV3



**Figure 9 : Le YM58483 provoque des changements morphologiques ressemblant à ceux induits par le CAI.**

Les lignées cellulaires ont été traitées pendant 48h (IGROV1-R10) par du YM58483 15  $\mu$ M ou 72h (OVCAR3 et SKOV3) par du YM58483 15  $\mu$ M et 20  $\mu$ M respectivement. A- La morphologie des cellules a été appréciée par microscopie optique à contraste de phase. B- l'expression de LC3 a été analysée par western blot.

Par ailleurs, ces changements morphologiques sont plus modestes chez les SKOV3 et les OVCAR3 et aucune vacuole correspondant au gonflement de l'espace péri-nucléaire n'a été observée dans ces 2 lignées avec ce traitement.

En ce qui concerne les marqueurs de l'autophagie, le YM58483 induit un passage de la forme I à la forme II chez les IGROV1-R10. Pour les OVCAR3, cet effet est plus modeste et le CAI a tendance à inhiber les 2 formes pour les SKOV3. L'expression de p62 devra être réalisée afin de confirmer ces résultats.

Par ailleurs, le YM58483 induit également une acidification du milieu de culture pour les 3 lignées testées (non montré ici). L'impact de cet inhibiteur de SOC sur l'activation de la pyruvate déshydrogénase et sur la respiration mitochondriale devra être évalué ultérieurement.

## **Discussion**

Cette étude a permis de mettre en évidence que le CAI était capable de provoquer des phénomènes d'autophagie particuliers qui s'apparentent à un processus d'autosis correspondant à une mort autophagique dans des conditions d'hypoxie. Cette mort s'accompagne de changements morphologiques importants mais n'est clairement visible que pour la lignée IGROV1-R10. La mort par autosis n'a pas de marqueur moléculaire spécifique et s'accompagne d'un passage de la forme LC3 I à la forme LC3 II et d'une disparition de la protéine p62, deux marqueurs classiques de l'autophagie. De façon étonnante, la morphologie particulière que prennent les cellules ainsi que l'apparition des marqueurs de l'autophagie sont toutes deux contrecarrées par les inhibiteurs de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ , faisant dire aux auteurs de l'article princeps que cet effet représente un marqueur de l'autosis. Nous avons mis en évidence que ces composés sont capables de contrecarrer l'inhibition de la voie mTOR induite par le CAI mais que cet effet est également retrouvé dans les lignées cellulaires qui ne présentent pas de morphologie d'autosis, ce qui sous-entend qu'un autre processus est nécessaire pour l'induction de cette mort. Enfin, l'expression de Beclin-1 n'est modulée par le CAI dans aucune lignée. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le CAI perturbe le métabolisme mitochondrial, inhibe la pyruvate déshydrogénase et bloque la chaîne respiratoire mitochondriale. Il entraîne donc des conditions cellulaires mimant des situations d'hypoxie.

### ***Poursuivre l'analyse moléculaire de l'autosis :***

Bien que les caractéristiques morphologiques de l'autosis apparaissent assez évidentes dans les IGROV1-R10, il serait souhaitable de poursuivre l'analyse moléculaire en essayant d'entraver

l'effet du CAI avec de la 3-méthyladénine un inhibiteur des PI3K de classe III ciblant par exemple la protéine Vps34.

De plus, bien que nous ayons réussi à mettre au point l'utilisation du siATG14, celui-ci n'a pas contrecarré l'effet du CAI. L'utilisation de shATG14, comme réalisé par l'équipe de Liu serait peut-être souhaitable d'autant qu'il vient d'être mis en évidence que les agents de transfection tels la lipofectamine et dans une moindre mesure le véhicule OptiMEM sont capables d'induire le passage de LC3 forme I à la forme II de manière mTOR et AMPK-indépendante. Ils perturbent également le transport d'électron au travers de la membrane mitochondriale et donc la respiration mitochondriale. La conclusion des auteurs souligne que l'utilisation des agents de transfection cationiques lipidiques nécessite une évaluation critique de leurs effets en particulier lors d'étude de phénomènes d'autophagie et de stress énergétique (Napoli et al., 2017).

#### ***Effets des inhibiteurs de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase sur la réversion de l'autosis***

L'inhibition de l'autosis par ces hétérosides cardiotoniques a été définie comme une caractéristique de cette mort par Liu *et al.*. Cependant, ces molécules ont depuis longtemps été décrites comme ayant une action anti-tumorale. Ainsi, les hétérosides cardiaques sont connus par exemple, pour bloquer la migration des cellules cancéreuses mammaires (cet effet étant attribué à une perturbation de la fonction d'antiport de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase et non à leur action sur la transduction de signaux) (Magpusao et al., 2015). Les effets anti-cancéreux de ces composés ont été observés de nombreuses fois dans diverses localisations (Haux et al., 2001). Cependant, dans un contexte de lésion cellulaire induite par l'ischémie/reperfusion, la ouabaïne a permis de protéger les cellules *via* l'induction des voies Erk et Akt (Belliard et al., 2016). Ainsi, la capacité de ces composés à induire la survie ou la mort cellulaire varie en fonction du contexte cellulaire. Les résultats présentés montrent que la ouabaïne contrecarre l'effet du CAI sur Mcl-1. Les molécules de cette classe devraient donc bloquer l'effet cytotoxique de la combinaison CAI + ABT-737 et donc conduire à d'éventuels échecs thérapeutiques en cas de co-administration.

#### ***Elargir l'étude à d'autres inhibiteurs de SOCE***

Il est maintenant bien décrit que les SOC jouent un rôle majeur dans la régulation de l'autophagie (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007) (Smaili et al., 2013). Selon un rapport récent, le 5-fluorouracile (5-FU) induit une autophagie dans les cellules HepG2 en diminuant l'expression d'Orai1. Par ailleurs, l'inactivation génique d'Orai1 et l'inhibition de SOCE par le SKF96365 augmentent la mort cellulaire autophagique induite par le 5-FU (Jing et al., 2016). Au contraire, dans les cellules progénitrices endothéliales, l'expression de STIM1 et l'entrée de calcium induisent une autophagie qui protège ces cellules des lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL) (Yang et al., 2017). Les



SOC peuvent donc avoir des rôles opposés dans la régulation de l'autophagie probablement dus aux différences de stress et aux disparités inhérentes aux modèles cellulaires utilisés dans ces études. (Tanwar and Motiani, 2017).

Comme le CAI, le YM58483 induit un changement morphologique des IGROV1-R10 mais pas des deux autres lignées cellulaires. Afin de compléter cette étude, une observation des cellules en MET serait nécessaire afin de vérifier que nous avons bien une ultrastructure semblable (vacuoles, espaces péri-nucléaires...) avec un autre inhibiteur de SOC. De plus, il serait également intéressant d'évaluer l'effet du YM58483 sur p62 et de vérifier que les inhibiteurs de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase sont capables de contrecarrer l'effet morphologique induit par le YM58483 dans les IGROV1-R10.

#### *L'inhibition de Bcl-2 pourrait faire basculer les cellules OVCAR3 et SKOV3 dans l'autosis*

Bien que les CAI et le YM58483 inhibent mTOR dans les 3 lignées, l'autosis n'est visible que pour IGROV1-R10. Par ailleurs, Becline-1 est exprimée dans les 3 lignées cellulaires mais n'est pas modulée après traitement par le CAI. Une des différences majeures entre les lignées IGROV1-R10 et OVCAR3 ou SKOV3 est que les cellules IGROV1-R10 n'expriment pas la protéine Bcl-2. Or Bcl-2 est connue pour piéger la protéine Becline-1, limitant de ce fait les phénomènes autophagiques (Zhou et al., 2011). Une inhibition de Bcl-2 dans les lignées OVCAR3 et SKOV3 devrait donc lever ce verrou et induire de l'autosis en présence de CAI. Nous testerons donc l'effet du CAI en présence d'ABT-199 (Vénétoclax), un inhibiteur spécifique de Bcl-2 (Souers et al., 2013) et évaluerons si les effets observés chez les IGROV1-R10 sont également retrouvés dans les autres lignées.

#### **Métabolisme mitochondrial**

Afin de poursuivre l'étude du métabolisme mitochondrial, il pourrait être envisagé de mesurer la quantité d'ATP produite en présence ou non de CAI et du YM58483 et de mesurer la quantité de lactate dans le milieu.

Les travaux de Mignen et al., ont montré que le CAI était capable de perturber le MCU dans les HEK293 (Mignen et al., 2005). Ce transporteur de calcium est connu pour avoir un rôle particulièrement important dans le devenir mitochondrial. Ainsi, dans les conditions normales, l'entrée de calcium favorise l'activation des enzymes du cycle de Krebs. Au contraire lors de d'une diminution de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mito</sub>, il inhibe la PDH ce qui a pour conséquence une inhibition de ce cycle, une inhibition de la respiration mitochondriale et un « switch » vers la production de lactate. Il serait donc intéressant de mesurer la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mito</sub> qui devrait être diminuée après traitement par le CAI ou le YM58483 par rapport aux conditions contrôle.

Ju R. et al., ont montré que le CAI était capable d'induire une acidification rapide du milieu cellulaire ainsi qu'une inhibition prononcée du complexe I de la phosphorylation oxydative entraînant une diminution drastique de la consommation d'oxygène et de la formation d'ATP (Ju et al., 2016). Or, il a été décrit qu'une diminution du pH extracellulaire (de 7.4 à 6.4) et intracellulaire entraîne une inhibition de l'activité de mTORC1 dans les cellules cancéreuses du sein MCF7 (Balgı et al., 2011). Afin de savoir si la perturbation du métabolisme de la mitochondrie est la cause de l'inhibition de l'activité de mTOR, il serait nécessaire de réaliser une cinétique de mesure de la respiration mitochondriale en présence de CAI. Il pourrait également être intéressant de tester des milieux d'acidité différente sur l'activité de mTORC1 dans nos modèles. Les variations de pH que nous avons observées sont plus faibles (0,3 unités de pH) mais elles peuvent avoir des conséquences dans notre modèle de carcinome ovarien.

Au vu de nos résultats, il serait donc possible d'avancer que le CAI en inhibant les SOC, diminue l'entrée de calcium dans la mitochondrie. Cela perturberait le métabolisme cellulaire, inhiberait la respiration mitochondriale et induirait la formation de lactate. Ce relargage de lactate dans la cellule acidifierait le milieu ce qui pourrait inhiber la voie mTOR. La libération de Becline-1 séquestrée par Bcl-2 permettrait alors de précipiter les cellules vers une mort par autophagie dans des conditions mimant l'hypoxie : l'autosis.

Cette hypothèse est corroborée par les essais menés par l'équipe de Liu (Liu et al., 2013) et notre étude de milieux conditionnés qui suggère qu'une acidification du milieu ainsi qu'un manque de nutriment tel le glucose sont nécessaires pour induire une mort par autophagie. Ainsi le CAI combiné au 2-déoxyglucose s'est révélé particulièrement efficace sur une lignée de carcinome de poumon (Ju et al., 2016) (Ju et al., 2016). Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Ces remarques rejoignent celles de l'équipe du Pr Pouyssegur qui souligne l'importance de diminuer fortement le pH ainsi que de bloquer le métabolisme mitochondrial (glycolyse et respiration oxydative ou « metabolic knife ») dans le but de carencer les cellules tumorales en ATP et d'induire une catastrophe métabolique entraînant une mort par autophagie (Mazure and Pouyssegur, 2010). Une combinaison ciblant ces systèmes pourrait avoir un intérêt thérapeutique puissant dans les traitements anti-cancéreux (Parks et al., 2013).

De façon très intéressante, Vaeth et al. ont montré sur un modèle de lymphocytes T que les SOC représentaient un acteur majeur de l'expansion clonale de ces cellules et du contrôle de leur métabolisme. Dans cette étude, il est démontré que les SOC jouent un rôle fondamental dans la prolifération des cellules T activées et que l'inactivation génique de STIM-1 abolit leur respiration

mitochondriale, l'induction des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, l'expression des enzymes clés de la glycolyse telles l'hexokinase et l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. Ainsi les SOCE constituent les régulateurs permettant de passer d'un métabolisme basal (lymphocyte quiescent) à un métabolisme accru (lymphocyte activé en expansion clonale) (Vaeth et al., 2017). Cette étude vient donc à l'appui de nos résultats et suggère donc un rôle fondamental de ces canaux dans l'ensemble des processus impliqués dans la cancérogenèse.

# Discussion générale

---

Les cancers de l’ovaire sont des cancers rares mais leur pronostic sombre fait d’eux la première cause de décès par cancer gynécologique. Cette pathologie est d’autant plus complexe qu’il existe plusieurs sous-types histologiques ayant des caractéristiques tissulaires et moléculaires particulières influençant le pronostic et la réponse au traitement. Parmi ces cancers, les cancers séreux de haut grade représentent environ 90% des cancers de l’ovaire et sont particulièrement agressifs. Leur prise en charge repose sur une chirurgie d’exérèse de la tumeur et sur une chimiothérapie à base de carboplatine et de paclitaxel. Cette association de médicaments a peu évolué, à l’exception de l’introduction de deux nouvelles molécules, l’antiangiogénique Bévacicumab, mais pour lequel les résultats sont controversés, et les inhibiteurs de PARP, utilisés en agent d’entretien uniquement chez les patientes sensibles au platine et porteuses d’une mutation d’un gène BRCA. Lors des essais cliniques réalisés, les inhibiteurs de PARP ont conduit à des effets prometteurs et ils semblent également bénéfiques aux patientes n’ayant pas de mutations des gènes de réparation. La mise sur le marché d’autres molécules de cette classe telle que le Niraparib et une éventuelle extension de leurs indications thérapeutiques pourront représenter un espoir d’augmentation de la survie des patientes. Malgré une bonne réponse initiale au traitement par chimiothérapie, une rechute apparaît dans la majorité des cas et est associée à une chimiorésistance. L’absence de molécules efficaces disponibles pour palier la chimiorésistance conduit au décès de la patiente. Partant de ce constat, de nombreux laboratoires s’attachent à mieux comprendre les mécanismes de développement de ce cancer et à trouver des cibles thérapeutiques pertinentes.

## Inhiber Mcl-1 pour sensibiliser aux stratégies anti-Bcl-x<sub>L</sub> :

Notre équipe a identifié une dérégulation des acteurs de la voie intrinsèque de la mort cellulaire par apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes. En effet, ces cellules qualifiées de «Primed to death» possèdent un taux important de molécules pro-apoptotiques BH3-only synthétisées et activées du fait du stress oncogénique, mais également une quantité importante de molécules anti-apoptotiques permettant de séquestrer les BH3-only et les pro-apoptotiques multi-domaines. Ceci constitue une opportunité thérapeutique puisque l’inhibition de ces anti-apoptotiques suffit alors à engendrer une mort cellulaire massive dans ces cellules. Ainsi, en inhibant des couples de molécules anti-apoptotiques, le laboratoire a montré que l’inhibition concomitante de Bcl-x<sub>L</sub> et de Mcl-1 suffit à restaurer l’apoptose dans nos modèles cellulaires en absence de chimiothérapie. (Brotin et al., 2010) Les espoirs d’une mise en place de cette stratégie thérapeutique ont été renforcés grâce au développement par le laboratoire Abbvie d’un composé BH3-mimétique anti-Bcl-x<sub>L</sub> : l’ABT-737, et

d'un dérivé administrable par voie orale, l'ABT-263. Notre équipe s'attache à valider différentes stratégies visant à inhiber Mcl-1.

#### *Stratégies d'inhibition directe et indirecte de Mcl-1 :*

L'étude de composés BH3-mimétiques de la famille des oligopyridines, synthétisés par le CERMN a permis la mise en évidence d'une molécule lead, le Pyridoclax. Les évaluations *in silico*, ont permis de montrer sa capacité à déplacer Bim et Bax de Mcl-1. Cette molécule permet d'inhiber efficacement Mcl-1 dans nos lignées cancéreuses ovariennes et d'induire la mort en combinaison avec l'ABT-737. (Gloaguen et al., 2015) (Thèse de Siham Hedir). Le développement de cette molécule et des autres molécules BH3-mimétiques tels que l'EU-5346 (compound 9) ou le S63845 représente alors un enjeu majeur, dans la mesure où à l'heure actuelle aucun BH3-mimétique inhibant efficacement Mcl-1 ne donne de résultats en clinique.

Une autre stratégie s'attache à inhiber Mcl-1 de façon indirecte. Dans ce cadre, le laboratoire a effectué un screening à haut débit d'une banque de 1500 miRNA grâce à la technique Xcelligence qui permet d'évaluer en temps réel l'adhérence des cellules à leur support, par la mesure de l'impédance. Ce screening a permis de mettre en évidence des miRNA dits «tueurs» en agent seul et d'autres ont été qualifiés de «sensibilisateurs» du fait de leur capacité à induire la mort en combinaison avec le cisplatine. La recherche des cibles de ces miRNA a permis de trouver de nouvelles stratégies et combinaisons thérapeutiques. Ainsi, la mise en évidence du miRNA 491-5p, qui cible Bcl-x<sub>L</sub>, induit l'apoptose dans la lignée cellulaire IGROV1-R10. Cette efficacité, en l'absence d'une inhibition directe de Mcl-1, s'explique par le fait que ce miRNA stabilise le BH3-only Bim qui séquestre alors Mcl-1. L'association du Cetuximab, de l'Erlotinib ou du Gefitinib, inhibiteurs de l'EGFR déjà en clinique pour le traitement de cancers, à l'ABT-737, permet de retrouver cet effet. (Denoyelle et al., 2014) L'inhibition des voies de signalisations cellulaires, semble donc avoir sa place dans la modulation de l'expression des membres la famille Bcl-2. Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré la pertinence d'inhiber les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt/mTOR pour inhiber Mcl-1 dans différents modèles. (Zhang et al., 2014) (Somnay et al., 2013) (Preuss et al., 2013) (Faber et al., 2014) (Konopleva et al., 2012b). L'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR semble d'autant plus pertinente dans les cancers de l'ovaire puisqu'elle y est particulièrement dérégulée et contrôle l'expression de Mcl-1. (Mabuchi et al., 2015) Parmi d'autres études, le laboratoire a montré que l'inhibition de cette voie par un double inhibiteur PI3K/mTOR, le BEZ-235 était capable d'inhiber Mcl-1 et d'induire l'apoptose en combinaison avec l'ABT-737 dans la lignée IGROV1-R10 ou en combinant l'AZD-8055 à l'ABT-737. (Jebahi et al., 2014) (Pétigny-Lechartier et al., 2017)

Par ailleurs, puisque ces voies de signalisations semblent régulées par le calcium, en particulier Akt et mTOR nous avons voulu mettre en évidence l'inhibition de Mcl-1 par l'inhibition du calcium. (Ay et al., 2013) (Gocher et al., 2017) (Gulati et al., 2008) (Li et al., 2016)

#### *Inhiber Mcl-1 via l'inhibition des flux calciques :*

La chélation calcique par le BAPTA-AM a permis de mettre en évidence l'inhibition traductionnelle de mcl-1 via l'inhibition de la voie mTORC1 par l'intermédiaire de la CaM, et la combinaison du BAPTA-AM à l'ABT-737 induit l'apoptose dans les lignées cancéreuses ovariennes IGROV1-R10 et SKOV3. (Bonfond et al., 2015) Ces travaux ont permis de faire la preuve de concept. Cependant, puisque la chélation calcique n'est pas utilisable en clinique, nous avons recherché une molécule thérapeutique inhibitrice des canaux calciques. A ce jour, et malgré la grande diversité de molécules ayant des propriétés inhibitrices des flux calciques, seule une dizaine de molécules fait l'objet d'essais cliniques dans les cancers. Nous nous sommes donc tournés vers le carboxyamidotriazole puisqu'il possède des propriétés anticancéreuses *in vitro*, *in vivo* et a donné un résultat encourageant en essai clinique dans les cancers de l'ovaire (Hussain et al., 2003).

Nous avons montré que cette molécule inhibe les canaux calciques capacitifs comme l'a également démontré Lodola *et al.*, Enfissi et nous avons mis en évidence, après 48h ou 72h de traitement selon les lignées cancéreuses, une inhibition de Mcl-1 mettant en jeu l'inhibition de mTORC1. (Enfissi et al., 2004) (Lodola et al., 2012) Nous avons ensuite reproduit ces résultats en utilisant un autre inhibiteur des SOC, le YM58483, mettant en évidence que l'inhibition des SOC induisait l'inhibition de mTOR et de Mcl-1. De plus, en combinaison avec l'ABT-737 ses inhibiteurs sont capables d'induire l'apoptose dans ces cellules.

#### →Utilisation du CAI pour ces propriétés anti-Mcl-1

Repositionner cette molécule en tant qu'inhibiteur de Mcl-1, à utiliser en agent seul dans des cancers surexprimant uniquement Mcl-1 comme certaines leucémies, ou dans de nouvelles combinaisons, tel que nous l'avons fait avec l'ABT-737 pourrait permettre d'induire une réponse cytotoxique au sein de tumeurs.

Cependant l'utilisation de l'ABT-263 induit une forte toxicité au niveau des plaquettes sanguines, dont la survie dépend de Bcl-x<sub>L</sub>. Le développement de thrombopénies a conduit la société Abbvie à arrêter le développement de cette molécule au profit de l'ABT-199. Cette molécule particulièrement prometteuse a déjà reçu l'approbation de la Food and Drug Administration pour le traitement de patients atteints de leucémies lymphoïdes chroniques et une autorisation temporaire d'utilisation en France. Néanmoins, cette molécule inhibe Bcl-2 et n'a que peu d'action sur Bcl-x<sub>L</sub>. Une autre stratégie

consiste alors à induire des pro-apoptotiques tels que Bim pour inverser la balance pro-/anti-apoptotiques et ainsi libérer Bax et Bak de leur séquestration par des anti-apoptotiques et promouvoir l'apoptose. L'étude de Petigny-Lechartier *et al.*, montre qu'une combinaison du Tramétinib (inhibiteur de MEK), qui permet l'induction de Bim, avec l'aSTORIS AZD8055, qui inhibe Mcl-1, induit l'apoptose dans la lignée cancéreuse IGROV1-R10. Il serait ainsi peut-être intéressant de combiner le CAI au tramétinib pour induire l'apoptose dans cette lignée cellulaire. (Pétigny-Lechartier *et al.*, 2017)

→ Utiliser le CAI pour ces propriétés cytostatiques :

Au cours de notre étude, nous avons pu observer l'effet anti-prolifératif du CAI et cet effet avait également été mis en évidence dans des cellules cancéreuses de vessie, de poumon, de glioblastome ou encore de sein. (Moody *et al.*, 2003) (Perabo *et al.*, 2004) (Jacobs *et al.*, 1997) (Lambert *et al.*, 1997) (Wasilenko *et al.*, 1996). Par ailleurs, Kohn *et al.*, ont suggéré l'intérêt d'utiliser ce genre de médicaments en thérapie anticancéreuse. En effet, l'administration d'une chimiothérapie cytotoxique peut avoir des effets importants sur les cellules saines (comme c'est le cas pour l'ABT-263). De plus, leur administration, bien qu'elle permette une régression rapide de la tumeur, est souvent suivie d'une rechute. Les cycles régressions-rechutes engendrés par ces cycles de chimiothérapies finissent par être létal pour le patient. L'utilisation de molécules cytostatiques permet, elle, de ralentir ou d'arrêter la prolifération et la dissémination tumorale, causant alors une stabilisation de la maladie. Kohn propose alors pour la prise en charge des cancers avancés, un traitement séquentiel combinant une molécule cytotoxique puis une seconde cytostatique, à la condition que la formulation de la molécule cytostatique soit pensée pour une administration simple et qu'elle soit bien tolérée pour être administrée sur de longues périodes. Le schéma thérapeutique prévoit l'administration dans un premier temps de l'agent cytotoxique pour permettre une réduction du volume tumoral puis l'administration de la molécule cytostatique pour permettre de retarder la progression de la maladie et donc augmenter la survie des patients. (Kohn and Liotta, 1995) (Figure 89)

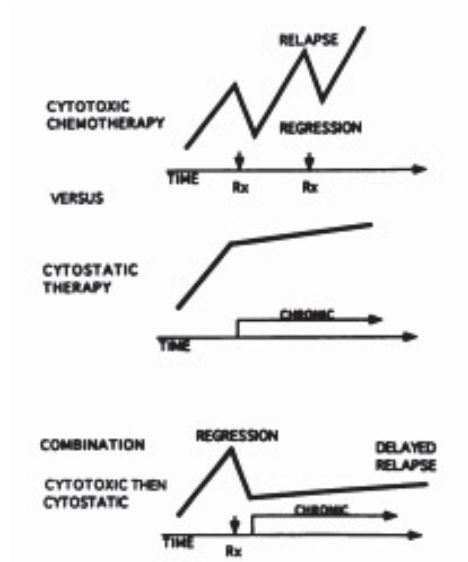


Figure 89 : Evolution du cancer en fonction de l'administration de médicaments cytotoxiques, cytostatiques ou d'un traitement séquentiel mettant en jeu ces deux catégories de médicaments. (Kohn et al., 1995)

Des patientes atteintes de cancer de l'ovaire avancé pourraient alors être traitées par une chimiothérapie classique combinant carboplatine et paclitaxel afin de réduire le volume tumoral, puis un traitement d'entretien avec du CAI pourrait être mis en place afin d'augmenter l'intervalle de temps avant une rechute.

Pertinence à inhiber le métabolisme pour traiter le cancer :

Perturber les flux calciques pour inhiber le métabolisme semble être une stratégie pertinente pour tuer les cellules cancéreuses. En effet, Cardenas *et al.*, ont montré que l'inhibition de la sortie de calcium du RE, induit une autophagie qui promeut la survie des cellules non cancéreuses alors que cette même inhibition au sein des cellules cancéreuses induit leur mort. En effet, les cellules cancéreuses sont dans un état de prolifération perpétuelle qui requiert une synthèse accrue de composés énergétiques. La diminution de l'entrée de calcium dans la mitochondrie inhibe alors le fonctionnement des enzymes dépendant du calcium dans le cycle de Krebs et un manque de ressources énergétiques fatal à la cellule cancéreuse. (Cárdenas et al., 2010)

Les résultats que nous avons obtenus avec le CAI pourraient s'expliquer par le fait que ce composé inhibe l'entrée de calcium mitochondriale bloquant alors le cycle de Krebs et de la respiration oxydative mitochondriale en aval. La baisse de calcium mitochondriale inhiberait la pyruvate déshydrogénase, ce qui favoriserait la transformation du pyruvate en lactate et induirait alors une acidification du pH et ainsi l'inhibition de mTORC1. (Balgi et al., 2011) Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Vaeth qui mettent en évidence le rôle primordial des SOC dans le contrôle du métabolisme énergétique. Il montre en effet que l'inhibition des SOC conduit à



l'inhibition de la respiration oxydative au profit de l'induction de la glycolyse, et à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, inhibant alors la prolifération. (Vaeth et al., 2017) Au vu de ces arguments, inhiber les SOC pour bloquer le processus tumoral semble donc être une stratégie particulièrement pertinente.

L'association de l'acidification du pH et du blocage du métabolisme énergétique paraît alors être une stratégie de choix pour induire une catastrophe métabolique et ainsi la mort sélective des cellules cancéreuses en situation hypermétaboliques. Elle peut être mise en place par l'inhibition des SOC. (Mazure and Pouysségur, 2010) (Vaeth et al., 2017)

#### L'autosis, un nouveau type de mort pour tuer les cellules cancéreuses ? :

L'autosis est une mort cellulaire caractérisée récemment par l'équipe de Levine (Liu et al., 2013). Il existe actuellement peu d'études sur l'effet de la mort par autosis. Il est donc difficile d'émettre un avis sur l'intérêt à tuer les cellules cancéreuses en induisant ce processus.

Dans l'étude princeps sur l'autosis, les auteurs montrent que c'est un type de mort qui dérive de l'autophagie. Cependant, ils n'étudient pas la modulation de mTOR dans la mise en place de ce phénomène. Or l'inhibition de mTOR est souvent un évènement indispensable à la mise en place de l'autophagie puisqu'elle permet la désequestration de ULK1 nécessaire à la nucléation. On peut donc se demander si mTOR est impliqué dans ce processus. Dans notre étude, l'autosis n'est visible que dans la lignée IGROV1-R10. L'inhibition de mTOR par le CAI et sa réactivation par la ouabaïne n'étant pas spécifique de la lignée IGROV1-R10, cette voie ne semble donc pas jouer un rôle dans la mise en place de l'autosis par le CAI.

Il existe cependant des études qui montrent que l'autophagie peut être régulée par le calcium de façon indépendante de mTOR. Ainsi, suite à un screening il a été observé que différents composés capables d'induire l'autophagie étaient en fait des inhibiteurs calciques. Cette étude a de plus montré qu'aucun de ces composés n'était capable de moduler la phosphorylation de mTOR, démontrant que ces produits induisaient des phénomènes en aval de cette protéine (Zhang et al., 2007). En outre, l'équipe de Williams montre que des inhibiteurs des VOCC de type L sont capables d'induire l'autophagie par un mécanisme impliquant l'inhibition des calpaïnes. (Williams et al., 2008) Il pourrait alors être pertinent d'étudier l'activité des calpaïnes dans nos cellules après traitement au CAI.

Une autre différence majeure entre nos résultats et les travaux de Liu est que le CAI n'induit pas la protéine Beclin-1, impliquée dans les processus de nucléation. Cette protéine possédant un domaine BH-3 peut être séquestrée par Bcl-2. Or, une des différences majeures existant entre les trois lignées

cellulaires cancéreuses ovariennes est l'absence de Bcl-2 dans les cellules IGROV1-R10, à la différence des SKOV3 et des OVCAR3. Beclin-1 pourrait alors être disponible pour initier l'autophagie sans avoir la nécessité d'être induite. Pour vérifier l'importance de Bcl-2 dans l'inhibition de l'autophagie, une combinaison du CAI avec l'ABT-199 serait à effectuer dans les lignées cellulaires SKOV3 et OVCAR3. L'induction d'autosis par cette combinaison pourrait alors être une stratégie pour tuer les cellules cancéreuses en diminuant les doses de CAI nécessaires pour tuer les cellules OVCAR3 et SKOV3.

Cette mort par autosis a été observée dans des cerveaux de rat, ayant subi des lésions de type ischémique. Cependant, le CAI semble bien toléré dans les études cliniques, à condition de ne pas dépasser 300 mg/m<sup>2</sup>, dose à laquelle des neuropathies ont été observées. (Berlin et al., 2002). Une combinaison avec l'ABT-199, également bien toléré, pourrait alors être intéressante à examiner si les études *in vitro* donnent des résultats positifs.

Par ailleurs, une étude de Zwerger *et al.*, a mis en évidence que des mutations du récepteur à la lamin B (LBR), exprimé au niveau de la membrane interne nucléaire, sont capables d'induire des phénomènes suggérant l'autosis. L'auteur a en effet observé en microscopie électronique la formation d'une vacuole associée au noyau, résultant de la séparation des membranes externe et interne. Le récepteur à la Lamine B possède une activité stérol-réductase. Cette perte d'activité peut altérer la synthèse du cholestérol et pourrait expliquer ce phénomène. L'autosis pourrait donc résulter d'un défaut de synthèse de ce composé membranaire. (Zwerger et al., 2010)

#### Repositionner des inhibiteurs calciques utilisés en clinique pour d'autres pathologies dans le traitement des cancers :

De nombreux inhibiteurs des flux calciques sont déjà couramment utilisés en clinique, notamment pour soigner des pathologies cardiaques telles que l'hypertension artérielle, l'angor ou les troubles du rythme. Les inhibiteurs des flux calciques anti-hypertenseurs utilisés en clinique aujourd'hui sont des inhibiteurs des VOCC de type L. Ils sont séparés en deux groupes : les dihydropyridines qui ont un effet préférentiel sur les cellules vasculaires (nifédipine, amlodipine, nicardipine par exemple) et les phényl-alkylamines (vérapamil) et benzothiazépines (Diltiazem) qui ont un effet vasculaire et cardiaque. Ils vont permettre de limiter l'entrée de calcium intracellulaire en réponse à une dépolarisation de la membrane, diminuant ainsi de façon directe ou indirecte la capacité contractile de la cellule. Parmi eux, plusieurs molécules ont pu démontrer leur effet anti-cancéreux.

Tout d'abord, une molécule utilisée en clinique contre l'angine de poitrine et l'hypertension, la nifédipine, a montré sa capacité à diminuer l'effet mitogénique de l'endothéline 1 dans des cellules de cancer du poumon. (Zhang et al., 2008) Cet inhibiteur est également capable de potentialiser les

effets du cisplatine dans des cellules de glioblastome. (Kondo et al., 1995) Cependant, une autre étude montre qu'une utilisation supérieure à 10 ans de ces anti-hypertenseurs augmente le risque de développer un cancer du sein. (Li et al., 2014) (Kale et al., 2015)

Le vérapamil possède également des effets anti-cancéreux dans certains modèles. *In vivo*, l'utilisation de cette molécule a une action anti-proliférative dans des modèles de tumeurs du sein et de méningiomes xéno greffés. (Taylor and Simpson, 1992) (Jensen and Wurster, 2001) Elle permet aussi d'augmenter la survie de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique résistant à l'anthracycline, en combinaison avec la Vindésine et le 5-fluorouracil. Ce composé possède également un effet anti-tumoral dans le cancer du poumon à non petites cellules en combinaison avec la vindesine et l'isofamide. (Belpomme et al., 2000) (Millward et al., 1993) Cependant, là encore, ces effets sont contestés puisqu'un essai clinique de phase III chez des patients atteints de myélome multiple n'a pas permis d'apporter de bénéfice clinique en combinaison avec les molécules du traitement de référence que sont la vincristine, la doxorubicine et la dexaméthasone. (Yoshida et al., 2003) (Kale et al., 2015)

Enfin, le mibéfradil a été approuvé par la Food and Drug Administration en 1997 comme anti-hypertenseur ciblant principalement les VOCC de type T. Retiré du marché peu après par son fabricant pour des raisons d'interactions médicamenteuses, il fait aujourd'hui l'objet d'un repositionnement comme molécule anticancéreuse dans le traitement des glioblastomes. (Kale et al., 2015) En effet, il est capable de cibler les cellules de glioblastomes et notamment les GSC (Glioblastoma Stem-like Cells), responsables de l'initiation, de la progression et de la résistance au traitement. Il permet alors un ralentissement de la croissance tumorale, sensibilise les cellules au traitement de référence, l'agent alkylant témozolomide et prolonge la survie des souris xéno greffées. (Zhang et al., 2017) Les résultats positifs de cette molécule ont permis de mettre en place un essai clinique de classe I dans le traitement des glioblastomes en combinaison avec le témozolomide. (Holdhoff et al., 2017)

Par ailleurs un médicament utilisé initialement comme antifongique, le Clotrimazole, en augmentant de façon massive la concentration calcium cytoplasmique et la déplétion des stocks intracellulaires, a montré sa capacité à induire l'apoptose des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë. (Ito et al., 2002) Enfin l'Itraconazole, autre anti-fongique azolé de la même famille que le CAI, a montré sa capacité à se lier directement au VDAC1 et à perturber la synthèse d'ATP, ce qui conduit alors à l'activation de l'AMPK et donc à l'inhibition de mTOR dans des cellules HUVEC (Head et al., 2015) (Head et al., 2017)

L'utilisation de molécules pharmacologiques modulatrices des flux calciques est donc courante, en particulier dans le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires, avec une bonne efficacité et des effets secondaires maîtrisés. Différents exemples en faveur d'un repositionnement de ces drogues dans le traitement des cancers ont été montrés et l'utilisation de ces molécules pourrait s'avérer intéressante dans certains cas, notamment en combinaison avec la chimiothérapie classique.

#### Pertinence de l'utilisation des inhibiteurs des flux calciques en clinique dans le traitement des cancers :

Hormis dans l'essai clinique de phase II dans lequel, le CAI stabilise l'état des patientes atteintes de cancers de l'ovaire d'environ 6 mois, les études cliniques ne montrent pas de bénéfice clinique à utiliser cette molécule. (Hussain et al., 2003) On peut donc se demander si le CAI a été utilisée pour de bonnes indications thérapeutiques. En effet, le CAI a été testé sur des cohortes de patients sans étude de l'expression des canaux calciques au sein de la tumeur, ni de l'implication de ces canaux dans le processus de cancérogenèse. Ceci semble aujourd'hui en désaccord avec les recommandations préalables à l'utilisation de modulateurs des flux calciques. En effet, il est recommandé de déterminer la nature moléculaire et l'isoforme spécifique de la protéine modulant le calcium et de déterminer dans quel type de cancer cette protéine est sur ou sous-exprimée. De plus, il est nécessaire de connaître le processus tumoral dépendant du calcium dans lequel cette protéine intervient, ainsi que les voies de signalisations qui régulent l'expression et la fonction de cette protéine mais également celles qui sont activées par le canal calcique d'intérêt. (Prevarskaya et al., 2013)

#### Comment aborder l'étude des flux calciques et leurs dérégulations dans les cellules cancéreuses ?

Nous avons choisi de commencer notre étude en validant l'hypothèse que le calcium intracellulaire pouvait moduler l'expression de Mcl-1 dans les cancers ovariens. Pour cela, nous avons utilisé un chélateur calcique intracellulaire donc un moyen d'inhibition du calcium non spécifique. Cette étude a permis de valider notre concept de départ. Cependant cette molécule n'est qu'un outil qui n'a aucun avenir en clinique. Nous avons ensuite choisi de tenter de moduler l'expression de Mcl-1 en utilisant le carboxyamidotriazole, connu pour moduler les VOC, les SOC, les IP3R et le MCU selon les modèles et parce que cette molécule, en essais cliniques dans les cancers, avait donné un résultat encourageant dans les cancers de l'ovaire. Nous avons alors étudié l'effet de cette molécule sur deux types de canaux ubiquitaires, les SOC et les IP3R et observé l'inhibition des SOC ainsi que celle de Mcl-1.

Cependant, les dérégulations des flux calciques sont nombreuses dans les cancers. Elles peuvent être différentes d'un cancer ou même d'un sous-type de cancer à l'autre, être multiples au sein d'un même cancer, et peuvent évoluer au cours du processus tumoral. (Dhennin-Duthille et al., 2011) Elles peuvent être induites par une mutation génétique, une modulation épigénétique ou post-traductionnelle des canaux, ou être liées à la modification de leur activité. De plus, la dérégulation d'un même canal peut induire des réponses cellulaires différentes en fonction des voies moléculaires modulées au sein des modèles cellulaires étudiés, ce qui rend l'étude de ces dérégulations complexe. Une approche des flux calciques de plus grande envergure, partant de l'étude de l'expression des canaux et pompes, semble donc plus pertinente pour trouver les cibles et les molécules thérapeutiques les plus efficaces. Il serait alors judicieux d'observer l'expression des canaux par des approches globales. La confection de puces permettant un screening à haut débit de l'expression protéique d'un grand nombre de canaux sur des lignées cellulaires ou de prélèvements tumoraux de patients serait intéressante. Ceci permettrait alors de dégager des profils d'expressions de ces canaux et de mettre en évidence les cibles les plus pertinentes dans ce type de cancer. Il serait alors possible de moduler l'expression ou l'activité du canal sélectionné par exemple en fonction de sa forte expression, pour observer les voies de signalisation qu'il régule et son implication éventuelle dans le processus tumoral. La différence d'expression pourrait également permettre d'établir des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement. Il serait également judicieux de pouvoir comparer l'expression des canaux calciques provenant de la tumeur d'un patient ainsi que de tissu adjacent sain afin de pouvoir mettre en évidence les altérations mises en place pendant le processus de cancérogénèse, altérations qui pourraient alors devenir des cibles thérapeutiques.

# Conclusion générale et perspectives

---

Le cancer de l'ovaire, détecté à un stade avancé, reste à ce jour un cancer au sombre pronostic. En effet, après l'acquisition d'une chimiorésistance, aucune alternative thérapeutique ne présente d'efficacité notable. Le laboratoire a mis en évidence la surexpression de Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 et la coopération de ces deux anti-apoptotiques pour inhiber la mort cellulaire. L'inhibition concomitante de ces deux protéines permet alors d'induire l'apoptose au sein de ces cellules. Tandis, que l'inhibition de Bcl-x<sub>L</sub> est possible grâce à l'utilisation du BH3-mimétique ABT-737, l'inhibition de Mcl-1 reste un enjeu majeur pour induire la mort cellulaire.

Nous avons par cette étude, prouvé que l'inhibition du calcium intracellulaire induit l'inhibition de mTOR et de Mcl-1. Nous avons montré également que les combinaisons du CAI et de l'YM58483 avec l'ABT-737 induisent l'apoptose au sein de nos lignées cancéreuses ovariennes chimiorésistantes. Nous mettons donc en évidence la pertinence à utiliser les inhibiteurs des flux calciques dans le traitement de cancers surexprimant Mcl-1.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un phénomène de mort par autosis induit par le CAI en agent seul dans la lignée cellulaire IGROV1-R10. Si la séquestration de Beclin-1 par Bcl-2 est responsable de la différence de mort engendrée par le CAI, une combinaison avec l'ABT-199 pourrait permettre d'induire l'autosis dans les lignées cellulaires exprimant Bcl-2. Cette combinaison pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique. (Figure 90)

La suite de ce projet consistera dans un premier temps en une étude plus globale des dérégulations des canaux calciques dans les cancers ovariens. Un screening de l'expression protéique de canaux calciques sera effectué sur un panel de lignées cellulaires ainsi que sur des prélèvements tumoraux inclus en paraffine de patientes opérées au Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse. Ce screening permettra de déterminer les canaux majoritairement surexprimés. L'impact de la modulation de l'expression ou de l'activité de ces canaux sur nos lignées de cellules cancéreuses sera alors étudié *in vitro*, puis sur des coupes de prélèvement de tissus tumoraux mis en culture *ex vivo* et enfin sur des cellules cancéreuses humaines xéno greffées *in vivo*. Nous espérons par cette étude cibler de façon plus spécifique les canaux et proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

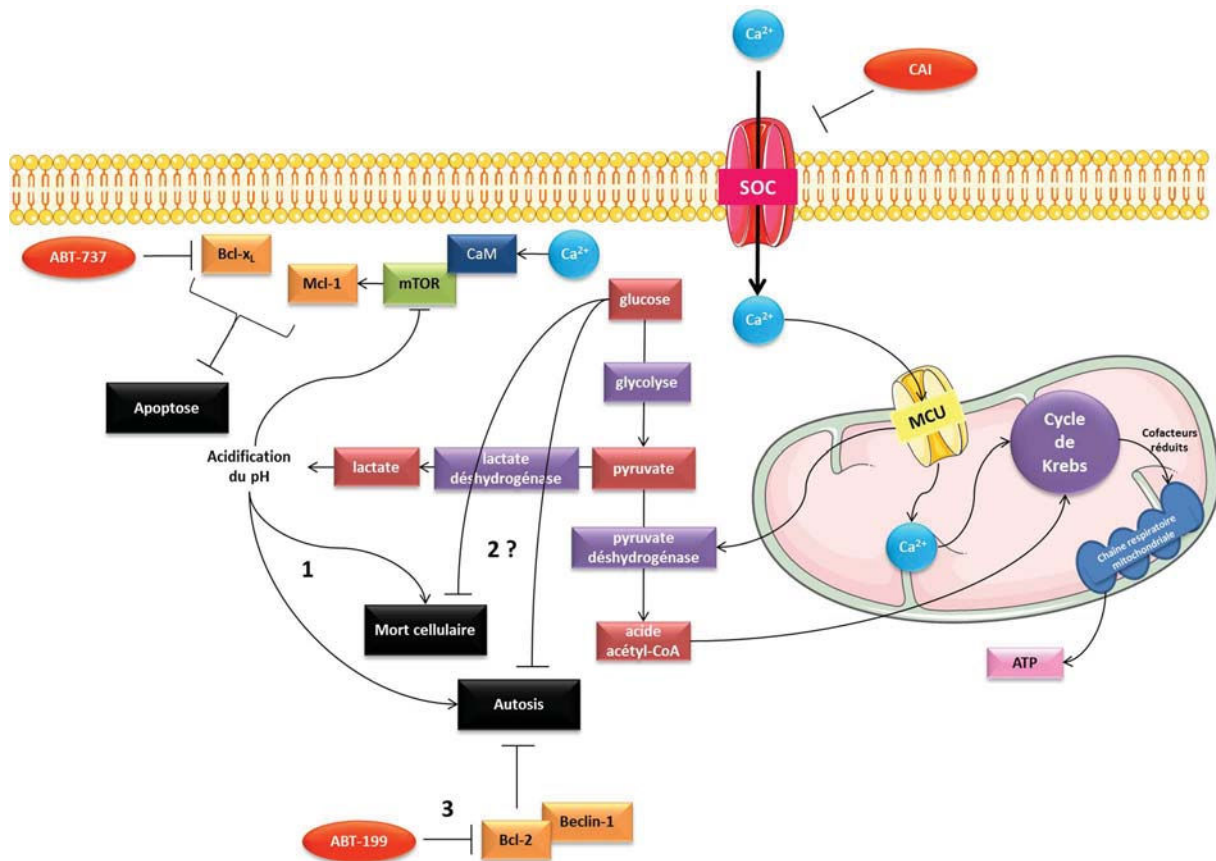


Figure 90 : Proposition d'un modèle intégré reflétant les effets du CAI dans notre étude.

Le CAI inhibe les SOC et donc l'entrée de calcium capacitive. Une quantité moins importante de cet ion entre dans la mitochondrie par le MCU ce qui empêche le fonctionnement du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale en aval. Ce phénomène empêche alors la synthèse d'ATP par cette voie et la cellule se met alors à fonctionner dans des conditions mimant l'hypoxie. La cellule utilise alors la glycolyse comme source majeure d'énergie. Le manque de calcium inhibe la pyruvate déshydrogénase et induit alors la transformation du pyruvate en lactate ce qui induit alors une acidification du pH cellulaire. Cette acidification peut alors inhiber le fonctionnement de mTOR et ainsi Mcl-1. La combinaison du CAI à l'ABT-737 conduit alors les cellules à l'apoptose. Par ailleurs cette diminution du pH (1) associée à une déprivation de glucose (2) liée à sa consommation massive au niveau de la glycolyse pourrait induire la mort cellulaire. Enfin, associée à ces deux premiers paramètres, l'inhibition de Bcl-2 (3) pourrait, par la libération de Beclin-1, engendrer une mort cellulaire qui dériverait de l'autophagie, l'autosis.

# Bibliographie

---

- Abulwerdi, F., Liao, C., Liu, M., Azmi, A.S., Aboukameel, A., Mady, A.S.A., Gulappa, T., Cierpicki, T., Owens, S., Zhang, T., et al. (2014). A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 565–575.
- Aghajanian, C., Goff, B., Nycum, L.R., Wang, Y.V., Husain, A., and Blank, S.V. (2015). Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *139*, 10–16.
- Ahn, T., Yun, C.-H., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2010). Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity of human Bax inhibitor-1. *Cell Calcium* *47*, 387–396.
- Akgul, C. (2009). Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 1326–1336.
- Akinleye, A., Furqan, M., Mukhi, N., Ravella, P., and Liu, D. (2013). MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *6*, 27.
- Alessandro, R., Masiero, L., Lapidos, K., Spoonster, J., and Kohn, E.C. (1998). Endothelial cell spreading on type IV collagen and spreading-induced FAK phosphorylation is regulated by Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *248*, 635–640.
- Alessandro, R., Fontana, S., Giordano, M., Corrado, C., Colomba, P., Flugy, A.M., Santoro, A., Kohn, E.C., and De Leo, G. (2008). Effects of carboxyamidotriazole on in vitro models of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *J. Cell. Physiol.* *215*, 111–121.
- Ambudkar, I.S., de Souza, L.B., and Ong, H.L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium* *63*, 33–39.
- Antoniou, A., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 1117–1130.
- Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012). Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J. Biol. Chem.* *287*, 23152–23161.
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W.J., Levenson, J.D., and Souers, A.J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 273–284.
- Ay, A.-S., Benzerdjeb, N., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Ahidouch, A., and Ouadid-Ahidouch, H. (2013). Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation. *PloS One* *8*, e72889.
- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., and Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int.* *9*, 23.



- Azad, N., Perroy, A., Gardner, E., Imamura, C.K., Graves, C., Sarosy, G.A., Minasian, L., Kotz, H., Raggio, M., Figg, W.D., et al. (2009). A phase I study of paclitaxel and continuous daily CAI in patients with refractory solid tumors. *Cancer Biol. Ther.* 8, 1800–1805.
- Baggstrom, M.Q., Qi, Y., Koczywas, M., Argiris, A., Johnson, E.A., Millward, M.J., Murphy, S.C., Erlichman, C., Rudin, C.M., Govindan, R., et al. (2011). A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 1757–1760.
- Balgi, A.D., Diering, G.H., Donohue, E., Lam, K.K.Y., Fonseca, B.D., Zimmerman, C., Numata, M., and Roberge, M. (2011). Regulation of mTORC1 signaling by pH. *PLoS One* 6, e21549.
- Bashashati, A., Ha, G., Tone, A., Ding, J., Prentice, L.M., Roth, A., Rosner, J., Shumansky, K., Kalloger, S., Senz, J., et al. (2013). Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J. Pathol.* 231, 21–34.
- Bauer, K.S., Figg, W.D., Hamilton, J.M., Jones, E.C., Premkumar, A., Steinberg, S.M., Dyer, V., Linehan, W.M., Pluda, J.M., and Reed, E. (1999). A pharmacokinetically guided Phase II study of carboxyamido-triazole in androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 2324–2329.
- Bauer, K.S., Cude, K.J., Dixon, S.C., Kruger, E.A., and Figg, W.D. (2000). Carboxyamido-triazole inhibits angiogenesis by blocking the calcium-mediated nitric-oxide synthase-vascular endothelial growth factor pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 31–37.
- Beaudeau, J., Dequen, L., and Foglietti, M. (1999). [Pathophysiologic aspects of S-100beta protein: a new biological marker of brain pathology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 57, 261–272.
- Beekman, A.M., and Howell, L.A. (2016). Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. *ChemMedChem* 11, 802–813.
- Beesoo, R., Neergheen-Bhujun, V., Bhagooli, R., and Bahorun, T. (2014). Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. *Mutat. Res.* 768, 84–97.
- Belliard, A., Gulati, G.K., Duan, Q., Alves, R., Brewer, S., Madan, N., Sottejeau, Y., Wang, X., Kalisz, J., and Pierre, S.V. (2016). Ischemia/reperfusion-induced alterations of enzymatic and signaling functions of the rat cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: protection by ouabain preconditioning. *Physiol. Rep.* 4.
- Belpomme, D., Gauthier, S., Pujade-Lauraine, E., Facchini, T., Goudier, M.J., Krakowski, I., Netter-Pinon, G., Frenay, M., Gousset, C., Marié, F.N., et al. (2000). Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 11, 1471–1476.
- Berchtold, M.W., and Villalobo, A. (2014). The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 398–435.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms.
- Berlin, J., Tutsch, K.D., Arzoomanian, R.Z., Alberti, D., Binger, K., Feierabend, C., Dresen, A., Marnocha, R., Pluda, J., and Wilding, G. (2002). Phase I and pharmacokinetic study of a micronized formulation of carboxyamidotriazole, a calcium signal transduction inhibitor: toxicity, bioavailability and the effect of food. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 86–94.

- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905.
- Berridge, M.J. (1997). The AM and FM of calcium signalling. *Nature* 386, 759–760.
- Berridge, M.J. (2012) *Cell Signalling Biology* ; doi:10.1042/csb0001003
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Berrieman, H.K., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2004). Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol.* 5, 158–164.
- Berwick, D.C., and Harvey, K. (2011). LRRK2 signaling pathways: the key to unlocking neurodegeneration? *Trends Cell Biol.* 21, 257–265.
- Bhalla, K.N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22, 9075–9086.
- Bhaskar, P.T., Nogueira, V., Patra, K.C., Jeon, S.-M., Park, Y., Robey, R.B., and Hay, N. (2009). mTORC1 hyperactivity inhibits serum deprivation-induced apoptosis via increased hexokinase II and GLUT1 expression, sustained Mcl-1 expression, and glycogen synthase kinase 3beta inhibition. *Mol. Cell Biol.* 29, 5136–5147.
- Billard, C. (2012). Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26, 2032–2038.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., and Whyte, M.K. (2000). Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 22136–22146.
- Birkinshaw, R.W., and Czabotar, P.E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (2001). VDAC channels. *IUBMB Life* 52, 113–118.
- Blagden, S.P. (2015). Harnessing Pandemonium: The Clinical Implications of Tumor Heterogeneity in Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* 5, 149.
- Bochis, R.J., Chabala, J.C., Harris, E., Peterson, L.H., Barash, L., Beattie, T., Brown, J.E., Graham, D.W., Waksmunski, F.S., and Tischler, M. (1991). Benzylated 1,2,3-triazoles as anticoccidiostats. *J. Med. Chem.* 34, 2843–2852.
- du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 115, 1234–1244.

- Bonnefond, M.-L., Lambert, B., Giffard, F., Abeilard, E., Brotin, E., Louis, M.-H., Gueye, M.S., Gauduchon, P., Poulain, L., and N'Diaye, M. (2015). Calcium signals inhibition sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-xL strategies through Mcl-1 down-regulation. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *20*, 535–550.
- Bootman, M.D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J.B., and Rietdorf, K. (2017). The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium*.
- Brachmann, S.M., Kleylein-Sohn, J., Gaulis, S., Kauffmann, A., Blommers, M.J.J., Kazic-Legueux, M., Laborde, L., Hattenberger, M., Stauffer, F., Vaxelaire, J., et al. (2012). Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1747–1757.
- Bray, K., Chen, H.-Y., Karp, C.M., May, M., Ganesan, S., Karantza-Wadsworth, V., DiPaola, R.S., and White, E. (2009). Bcl-2 modulation to activate apoptosis in prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* *7*, 1487–1496.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2011). The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Brotin, E., Meryet-Figuière, M., Simonin, K., Duval, R.E., Villedieu, M., Leroy-Dudal, J., Saison-Behmoaras, E., Gauduchon, P., Denoyelle, C., and Poulain, L. (2010). Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer* *126*, 885–895.
- Brouland, J.-P., Gélébart, P., Kovács, T., Enouf, J., Grossmann, J., and Papp, B. (2005). The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* *167*, 233–242.
- Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., et al. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2473–2483.
- Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.-M., and Kohn, E.C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* *120*, 3446–3456.
- Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., and Hamm, H.E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* *24*, 765–781.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *36*, 107–260.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.-H., Yang, J., Parker, I., et al. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell* *142*, 270–283.
- Cardenas, C., Alvero, A.B., Yun, B.S., and Mor, G. (2016). Redefining the origin and evolution of ovarian cancer: a hormonal connection. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, R411-422.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *75*, 50–83.

- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Chemaly, E.R., Troncione, L., and Lebeche, D. (2017). SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium*.
- Chen, C., Ju, R., Shi, J., Chen, W., Sun, F., Zhu, L., Li, J., Zhang, D., Ye, C., and Guo, L. (2017). Carboxyamidotriazole Synergizes with Sorafenib to Combat Non-Small Cell Lung Cancer through Inhibition of NANOG and Aggravation of Apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 362, 219–229.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* 276, 30724–30728.
- Chen, Y., Henson, E.S., Xiao, W., Huang, D., McMillan-Ward, E.M., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2016). Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia. *Autophagy* 12, 1029–1046.
- Chen, Y.-F., Chen, Y.-T., Chiu, W.-T., and Shen, M.-R. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 20, 23.
- Cheng, D., Xu, Y., Sun, C., and He, Z. (2016). MicroRNA-451 sensitizes lung cancer cells to cisplatin through regulation of Mcl-1. *Mol. Cell. Biochem.* 423, 85–91.
- Chu, C.S., Boyer, J., Schullery, D.S., Gimotty, P.A., Gamerman, V., Bender, J., Levine, B.L., Coukos, G., Rubin, S.C., Morgan, M.A., et al. (2012). Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 629–641.
- Cicchini, M., Karantza, V., and Xia, B. (2015). Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 498–504.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
- Cockcroft, S. (2006). The latest phospholipase C, PLC $\epsilon$ , is implicated in neuronal function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 4–7.
- Conus, N.M., Hemmings, B.A., and Pearson, R.B. (1998). Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J. Biol. Chem.* 273, 4776–4782.
- Corrado, C., Raimondo, S., Flugy, A.M., Fontana, S., Santoro, A., Stassi, G., Marfia, A., Iovino, F., Arlinghaus, R., Kohn, E.C., et al. (2011). Carboxyamidotriazole inhibits cell growth of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells including T315I Bcr-Abl mutant by a redox-mediated mechanism. *Cancer Lett.* 300, 205–214.
- Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., and Meyer-Fernandes, J.R. (2012). Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10697–10721.
- Criollo, A., Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A.A., Andrews, D., Molgó, J., Díaz, J., Lavandero, S., Harper, F., et al. (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ.* 14, 1029–1039.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., and Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 7, 3–17.

- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Daft, P.G., Yuan, K., Warram, J.M., Klein, M.J., Siegal, G.P., and Zayzafoon, M. (2013). Alpha-CaMKII plays a critical role in determining the aggressive behavior of human osteosarcoma. *Mol. Cancer Res. MCR* *11*, 349–359.
- Dai, L., Zhuang, L., Zhang, B., Wang, F., Chen, X., Xia, C., and Zhang, B. (2015). DAG/PKC $\delta$  and IP3/Ca<sup>2+</sup>/CaMK II $\beta$  Operate in Parallel to Each Other in PLC $\gamma$ 1-Driven Cell Proliferation and Migration of Human Gastric Adenocarcinoma Cells, through Akt/mTOR/S6 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 28510–28522.
- Davis, F.M., Azimi, I., Faville, R.A., Peters, A.A., Jalink, K., Putney, J.W., Goodhill, G.J., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* *33*, 2307–2316.
- Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Hinds, M.G. (2005). Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J. Biol. Chem.* *280*, 4738–4744.
- De Stefani, D., Patron, M., and Rizzuto, R. (2015). Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 2006–2011.
- Decuypere, J.-P., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2012). Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* *1*, 284–312.
- Denoyelle, C., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Vigneron, N., Brotin, E., Lecerf, C., Abeilard, E., Giffard, F., Louis, M.-H., Gauduchon, P., et al. (2014). miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis.* *5*, e1445.
- Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2004). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* *279*, 26915–26921.
- Desai, A.A., Innocenti, F., Janisch, L., DeMario, M., Shepard, D., Ramirez, J., Fleming, G.F., and Ratain, M.J. (2004). A phase I trial of pharmacokinetic modulation of carboxyamidotriazole (CAI) with ketoconazole in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *54*, 377–384.
- Devouassoux-Shisheboran, M., and Genestie, C. (2015). Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chin. J. Cancer* *34*, 50–55.
- Dheer, D., Singh, V., and Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chem.* *71*, 30–54.
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *28*, 813–822.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J.-Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.-J., Yang, Y., Lai, C.-C., Lee, D.-F., et al. (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 6109–6117.

- Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D., Cai, R., Jin, Y., Dong, B., Xu, Y., et al. (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 1052–1068.
- Dolphin, A.C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* *147 Suppl 1*, S56-62.
- Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* *23*, 5301–5315.
- Dong, B., Valencia, C.A., and Liu, R. (2007). Ca(2+)/calmodulin directly interacts with the pleckstrin homology domain of AKT1. *J. Biol. Chem.* *282*, 25131–25140.
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 79–94.
- Dragoni, S., Turin, I., Laforenza, U., Potenza, D.M., Bottino, C., Glasnov, T.N., Prestia, M., Ferulli, F., Saitta, A., Mosca, A., et al. (2014). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry does not control proliferation in primary cultures of human metastatic renal cellular carcinoma. *BioMed Res. Int.* *2014*, 739494.
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., Lehen'kyi, V., Gkika, D., Guarmit, B., Lepage, G., Slomianny, C., Borowiec, A.S., Bidaux, G., Benahmed, M., et al. (2014). Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell* *26*, 19–32.
- Dubois, C., Prevarskaya, N., and Vanden Abeele, F. (2016). The calcium-signaling toolkit: Updates needed. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 1337–1343.
- Dutcher, J.P., Leon, L., Manola, J., Friedland, D.M., Roth, B., Wilding, G., and Eastern Cooperative Oncology Group (2005). Phase II study of carboxyamidotriazole in patients with advanced renal cell carcinoma refractory to immunotherapy: E4896, an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer* *104*, 2392–2399.
- Dziegielewska, B., Casarez, E.V., Yang, W.Z., Gray, L.S., Dziegielewski, J., and Slack-Davis, J.K. (2016). T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Inhibition Sensitizes Ovarian Cancer to Carboplatin. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 460–470.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* *145*, 104–116.
- Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., and Capiod, T. (2004). The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* *36*, 459–467.
- Engedal, N., Torgersen, M.L., Guldvik, I.J., Barfeld, S.J., Bakula, D., Sætre, F., Hagen, L.K., Patterson, J.B., Proikas-Cezanne, T., Seglen, P.O., et al. (2013). Modulation of intracellular calcium homeostasis blocks autophagosome formation. *Autophagy* *9*, 1475–1490.
- Epling-Burnette, P.K., and Loughran, T.P. (2010). Suppression of farnesyltransferase activity in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: current understanding and recommended use of tipifarnib. *Expert Opin. Investig. Drugs* *19*, 689–698.

- Faber, A.C., Coffee, E.M., Costa, C., Dastur, A., Ebi, H., Hata, A.N., Yeo, A.T., Edelman, E.J., Song, Y., Tam, A.T., et al. (2014). mTOR inhibition specifically sensitizes colorectal cancers with KRAS or BRAF mutations to BCL-2/BCL-XL inhibition by suppressing MCL-1. *Cancer Discov.* *4*, 42–52.
- Faehling, M., Kroll, J., Föhr, K.J., Fellbrich, G., Mayr, U., Trischler, G., and Waltenberger, J. (2002). Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1805–1807.
- Fan, L., Li, A., Li, W., Cai, P., Yang, B., Zhang, M., Gu, Y., Shu, Y., Sun, Y., Shen, Y., et al. (2014). Novel role of Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 in development of colorectal cancer and its regulation by F36, a curcumin analog. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *68*, 1141–1148.
- Fantauzzo, K.A., and Soriano, P. (2015). Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Regulating Neural Crest Development One Phosphate at a Time. *Curr. Top. Dev. Biol.* *111*, 135–182.
- Faouzi, M., Kischel, P., Hague, F., Ahidouch, A., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Penner, R., and Ouadid-Ahidouch, H. (2013). ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 752–760.
- Fathalla, M.F. (2013). Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts Views Vis. ObGyn* *5*, 292–297.
- Fecteau, J.-F., Bharati, I.S., O’Hayre, M., Handel, T.M., Kipps, T.J., and Messmer, D. (2012a). Sorafenib-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is associated with downregulation of RAF and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1). *Mol. Med. Camb. Mass* *18*, 19–28.
- Fecteau, J.-F., Bharati, I.S., O’Hayre, M., Handel, T.M., Kipps, T.J., and Messmer, D. (2012b). Sorafenib-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is associated with downregulation of RAF and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1). *Mol. Med. Camb. Mass* *18*, 19–28.
- Felder, C.C., Ma, A.L., Liotta, L.A., and Kohn, E.C. (1991). The antiproliferative and antimetastatic compound L651582 inhibits muscarinic acetylcholine receptor-stimulated calcium influx and arachidonic acid release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *257*, 967–971.
- Figg, W.D., Cole, K.A., Reed, E., Steinberg, S.M., Piscitelli, S.C., Davis, P.A., Soltis, M.J., Jacob, J., Boudoulas, S., and Goldspiel, B. (1995). Pharmacokinetics of orally administered carboxyamidotriazole, an inhibitor of calcium-mediated signal transduction. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *1*, 797–803.
- Filippi-Chiela, E.C., Viegas, M.S., Thomé, M.P., Buffon, A., Wink, M.R., and Lenz, G. (2016). Modulation of Autophagy by Calcium Signalosome in Human Disease. *Mol. Pharmacol.* *90*, 371–384.
- Fiorio Pla, A., Grange, C., Antoniotti, S., Tomatis, C., Merlino, A., Bussolati, B., and Munaron, L. (2008). Arachidonic acid-induced Ca<sup>2+</sup> entry is involved in early steps of tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 535–545.
- Fiorio Pla, A., Genova, T., Pupo, E., Tomatis, C., Genazzani, A., Zaninetti, R., and Munaron, L. (2010). Multiple roles of protein kinase a in arachidonic acid-mediated Ca<sup>2+</sup> entry and tumor-derived human endothelial cell migration. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 1466–1476.

- Franklin, A.J., Jetton, T.L., Kuchemann, C.L., Russell, S.R., and Kohn, E.C. (2004). CAI is a potent inhibitor of neovascularization and imparts neuroprotection in a mouse model of ischemic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *45*, 3756–3766.
- Fujita, K., Ikarashi, H., Takakuwa, K., Kodama, S., Tokunaga, A., Takahashi, T., and Tanaka, K. (1995). Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *1*, 501–507.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* *5*, e1257.
- Ganley, I.G., Wong, P.-M., Gammoh, N., and Jiang, X. (2011). Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Mol. Cell* *42*, 731–743.
- Ge, R., Tai, Y., Sun, Y., Zhou, K., Yang, S., Cheng, T., Zou, Q., Shen, F., and Wang, Y. (2009). Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett.* *283*, 43–51.
- Ge, S., Rempel, S.A., Divine, G., and Mikkelsen, T. (2000). Carboxyamido-triazole induces apoptosis in bovine aortic endothelial and human glioma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1248–1254.
- Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., and Knecht, E. (2012). Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$  (CaMKK- $\beta$ ). *J. Biol. Chem.* *287*, 38625–38636.
- Giannakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y.K., Zhan, Z., Buters, J.T., Fojo, T., and Poruchynsky, M.S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.* *272*, 17118–17125.
- Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., and Silva, A.J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* *279*, 870–873.
- Glancy, B., and Balaban, R.S. (2012). Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 2959–2973.
- Gloaguen, C., Voisin-Chiret, A.S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Fogha, J., Gautier, F., De Giorgi, M., Burzicki, G., Perato, S., Pétigny-Lechartier, C., Simonin-Le Jeune, K., et al. (2015). First evidence that oligopyridines,  $\alpha$ -helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies. *J. Med. Chem.* *58*, 1644–1668.
- Gocher, A.M., Azabdaftari, G., Euscher, L.M., Dai, S., Karacosta, L.G., Franke, T.F., and Edelman, A.M. (2017). Akt activation by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* *292*, 14188–14204.
- Goode, A., Gilbert, B., Harkes, J., Jukic, D., and Satyanarayanan, M. (2013). OpenSlide: A vendor-neutral software foundation for digital pathology. *J. Pathol. Inform.* *4*, 27.
- Gotlieb, W.H., Amant, F., Advani, S., Goswami, C., Hirte, H., Provencher, D., Somani, N., Yamada, S.D., Tamby, J.-F., and Vergote, I. (2012). Intravenous aflibercept for treatment of recurrent symptomatic malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Oncol.* *13*, 154–162.



- Graves, L.M., He, Y., Lambert, J., Hunter, D., Li, X., and Earp, H.S. (1997). An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1920–1928.
- Gresset, A., Sondek, J., and Harden, T.K. (2012). The Phospholipase C Isozymes and Their Regulation. *Subcell. Biochem.* 58, 61–94.
- Grunewald, T., and Ledermann, J.A. (2017). Targeted Therapies for Ovarian Cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 41, 139–152.
- Gruosso, T., Garnier, C., Abelanet, S., Kieffer, Y., Lemesre, V., Bellanger, D., Bieche, I., Marangoni, E., Sastre-Garau, X., Mieulet, V., et al. (2015). MAP3K8/TPL-2/COT is a potential predictive marker for MEK inhibitor treatment in high-grade serous ovarian carcinomas. *Nat. Commun.* 6, 8583.
- Guéguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., Chantôme, A., Haelters, J.P., Jaffrès, P.A., Jourdan, M.L., et al. (2016). 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* 7, 36168–36184.
- GUIDE - AFFECTION LONGUE DURÉE Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer de l'ovaire (2010) HAS-INCa
- Gulati, P., Gaspers, L.D., Dann, S.G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., Kozma, S.C., Thomas, A.P., and Thomas, G. (2008). Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca<sup>2+</sup>/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab.* 7, 456–465.
- Guo, H., Zhong, Y., Jackson, A.L., Clark, L.H., Kilgore, J., Zhang, L., Han, J., Sheng, X., Gilliam, T.P., Gehrig, P.A., et al. (2016). Everolimus exhibits anti-tumorigenic activity in obesity-induced ovarian cancer. *Oncotarget* 7, 20338–20356.
- Guo, J., Lao, Y., and Chang, D.C. (2009). Calcium and Apoptosis. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, A. Lajtha, and K. Mikoshiba, eds. (Springer US), pp. 597–622.
- Guo, L., Li, Z.-S., Wang, H.-L., Ye, C.-Y., and Zhang, D.-C. (2006). Carboxyamido-triazole inhibits proliferation of human breast cancer cells via G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 538, 15–22.
- Guo, L., Ye, C., Chen, W., Ye, H., Zheng, R., Li, J., Yang, H., Yu, X., and Zhang, D. (2008). Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxamidotriazole, a tumorostatic agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 10–16.
- Gusovsky, F., Lueders, J.E., Kohn, E.C., and Felder, C.C. (1993). Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma. An alternative mechanism for cholinergic-induced phosphoinositide breakdown. *J. Biol. Chem.* 268, 7768–7772.
- Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., et al. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3360–3365.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haux, J., Klepp, O., Spigset, O., and Tretli, S. (2001). Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. *BMC Cancer* 1, 11.

Head, S.A., Shi, W., Zhao, L., Gorshkov, K., Pasunooti, K., Chen, Y., Deng, Z., Li, R., Shim, J.S., Tan, W., et al. (2015). Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E7276-7285.

Head, S.A., Shi, W.Q., Yang, E.J., Nacev, B.A., Hong, S.Y., Pasunooti, K.K., Li, R.-J., Shim, J.S., and Liu, J.O. (2017). Simultaneous Targeting of NPC1 and VDAC1 by Itraconazole Leads to Synergistic Inhibition of mTOR Signaling and Angiogenesis. *ACS Chem. Biol.* *12*, 174–182.

Hewavitharana, T., Deng, X., Wang, Y., Ritchie, M.F., Girish, G.V., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2008). Location and function of STIM1 in the activation of Ca<sup>2+</sup> entry signals. *J. Biol. Chem.* *283*, 26252–26262.

High, L.M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S.L., Vikstrom, I.B., Roberts, A.W., and Lock, R.B. (2010). The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Mol. Pharmacol.* *77*, 483–494.

Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Shigekawa, M., Iwase, K., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., et al. (2010). The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatol. Baltim. Md* *52*, 1310–1321.

Hillman, S.L., Mandrekar, S.J., Bot, B., DeMatteo, R.P., Perez, E.A., Ballman, K.V., Nelson, H., Buckner, J.C., and Sargent, D.J. (2010). Evaluation of the value of attribution in the interpretation of adverse event data: a North Central Cancer Treatment Group and American College of Surgeons Oncology Group investigation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3002–3007.

Hoenderop, J.G.J., and Bindels, R.J.M. (2008). Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiol. Bethesda Md* *23*, 32–40.

Hoffmann, S., He, S., Jin, M.L., Masiero, L., Wiedemann, P., Ryan, S.J., and Kohn, E.C. (2005). Carboxyamido-triazole modulates retinal pigment epithelial and choroidal endothelial cell attachment, migration, proliferation, and MMP-2 secretion of choroidal endothelial cells. *Curr. Eye Res.* *30*, 103–113.

Holdhoff, M., Ye, X., Supko, J.G., Nabors, L.B., Desai, A.S., Walbert, T., Lesser, G.J., Read, W.L., Lieberman, F.S., Lodge, M.A., et al. (2017). Timed sequential therapy of the selective T-type calcium channel blocker mibefradil and temozolomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* *19*, 845–852.

Holmes, D. (2011). PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 563–564.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/), based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* *3*, 381–383.

Hsieh, A.C., Costa, M., Zollo, O., Davis, C., Feldman, M.E., Testa, J.R., Meyuhas, O., Shokat, K.M., and Ruggero, D. (2010). Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* *17*, 249–261.

- Huang, H., Shah, K., Bradbury, N.A., Li, C., and White, C. (2014). Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death Dis.* 5, e1482.
- Hudmon, A., and Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 364, 593–611.
- Hupe, D.J., Boltz, R., Cohen, C.J., Felix, J., Ham, E., Miller, D., Soderman, D., and Van Skiver, D. (1991). The inhibition of receptor-mediated and voltage-dependent calcium entry by the antiproliferative L-651,582. *J. Biol. Chem.* 266, 10136–10142.
- Hussain, M.M., Kotz, H., Minasian, L., Premkumar, A., Sarosy, G., Reed, E., Zhai, S., Steinberg, S.M., Raggio, M., Oliver, V.K., et al. (2003). Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 4356–4363.
- Icard, P., and Lincet, H. (2013). [The cancer tumor: a metabolic parasite?]. *Bull. Cancer (Paris)* 100, 427–433.
- Ikeda, S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255–258.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., and Ichijo, H. (2002). Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277, 43730–43734.
- Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Guicciardi, M.E., Frank, D.A., and Gores, G.J. (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 42, 1329–1338.
- Ito, C., Tecchio, C., Coustan-Smith, E., Suzuki, T., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pui, C.-H., and Campana, D. (2002). The antifungal antibiotic clotrimazole alters calcium homeostasis of leukemic lymphoblasts and induces apoptosis. *Leukemia* 16, 1344–1352.
- Jacobs, W., Mikkelsen, T., Smith, R., Nelson, K., Rosenblum, M.L., and Kohn, E.C. (1997). Inhibitory effects of CAI in glioblastoma growth and invasion. *J. Neurooncol.* 32, 93–101.
- Jardin, I., and Rosado, J.A. (2016). STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1418–1426.
- Jebahi, A., Villedieu, M., Pétigny-Lechartier, C., Brotin, E., Louis, M.-H., Abeilard, E., Giffard, F., Guercio, M., Briand, M., Gauduchon, P., et al. (2014). PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies, provided that Bim expression is induced. *Cancer Lett.* 348, 38–49.
- Jensen, R.L., and Wurster, R.D. (2001). Calcium channel antagonists inhibit growth of subcutaneous xenograft meningiomas in nude mice. *Surg. Neurol.* 55, 275–283.
- Jiang, C.C., Lucas, K., Avery-Kiejda, K.A., Wade, M., deBock, C.E., Thorne, R.F., Allen, J., Hersey, P., and Zhang, X.D. (2008). Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 68, 6708–6717.
- Jin, H.-O., Hong, S.-E., Woo, S.-H., Lee, J.-H., Choe, T.-B., Kim, E.-K., Noh, W.-C., Lee, J.-K., Hong, S.-I., Kim, J.-I., et al. (2012). Silencing of Twist1 sensitizes NSCLC cells to cisplatin via AMPK-activated mTOR inhibition. *Cell Death Dis.* 3, e319.

- Jing, Z., Sui, X., Yao, J., Xie, J., Jiang, L., Zhou, Y., Pan, H., and Han, W. (2016). SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKII $\alpha$ /AKT-mediated pathway. *Cancer Lett.* *372*, 226–238.
- Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Johnson, E.A., Marks, R.S., Mandrekar, S.J., Hillman, S.L., Hauge, M.D., Bauman, M.D., Wos, E.J., Moore, D.F., Kugler, J.W., Windschitl, H.E., et al. (2008). Phase III randomized, double-blind study of maintenance CAI or placebo in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after completion of initial therapy (NCCTG 97-24-51). *Lung Cancer Amst. Neth.* *60*, 200–207.
- Ju, R., Guo, L., Li, J., Zhu, L., Yu, X., Chen, C., Chen, W., Ye, C., and Zhang, D. (2016). Carboxyamidotriazole inhibits oxidative phosphorylation in cancer cells and exerts synergistic anti-cancer effect with glycolysis inhibition. *Cancer Lett.* *370*, 232–241.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 455–465.
- Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 908–921.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1287–1295.
- Kale, V.P., Amin, S.G., and Pandey, M.K. (2015). Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochim. Biophys. Acta* *1848*, 2747–2755.
- Kalyanaraman, B. (2017). Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol.* *12*, 833–842.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 1126–1132.
- Kar, P., and Parekh, A.B. (2015). Distinct spatial Ca<sup>2+</sup> signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Mol. Cell* *58*, 232–243.
- Karlan, B.Y., Alvarez, R.D., and Strauss, J.F. (2016). Evolving Paradigms in Research and Care in Ovarian Cancers. *Obstet. Gynecol.* *128*, 771–774.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 194–204.
- Kaye, S.B., Fehrenbacher, L., Holloway, R., Amit, A., Karlan, B., Slomovitz, B., Sabbatini, P., Fu, L., Yauch, R.L., Chang, I., et al. (2012). A phase II, randomized, placebo-controlled study of vismodegib as maintenance therapy in patients with ovarian cancer in second or third complete remission. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6509–6518.
- Kazi, A., Sun, J., Doi, K., Sung, S.-S., Takahashi, Y., Yin, H., Rodriguez, J.M., Becerril, J., Berndt, N., Hamilton, A.D., et al. (2011). The BH3  $\alpha$ -Helical Mimic BH3-M6 Disrupts Bcl-XL, Bcl-2, and MCL-1 Protein-Protein Interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and Induces Apoptosis in a Bax- and Bim-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* *286*, 9382–9392.

- Ke, Z., Liang, D., Zeng, Q., Ren, Q., Ma, H., Gui, L., Chen, S., Guo, M., Xu, Y., Gao, W., et al. (2013). hsBAFF promotes proliferation and survival in cultured B lymphocytes via calcium signaling activation of mTOR pathway. *Cytokine* 62, 310–321.
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Yee, M.-K.W., Mock, D.C., Lawson, G.W., and Gwack, Y. (2011). ORAI1 deficiency impairs activated T cell death and enhances T cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 3620–3630.
- Kim, M.-J., Jo, D.-G., Hong, G.-S., Kim, B.J., Lai, M., Cho, D.-H., Kim, K.-W., Bandyopadhyay, A., Hong, Y.-M., Kim, D.H., et al. (2002). Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9870–9875.
- Kobayashi, S., Yamashita, K., Takeoka, T., Ohtsuki, T., Suzuki, Y., Takahashi, R., Yamamoto, K., Kaufmann, S.H., Uchiyama, T., Sasada, M., et al. (2002). Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J. Biol. Chem.* 277, 33968–33977.
- Kobayashi, S., Lee, S.-H., Meng, X.W., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Craig, R.W., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 282, 18407–18417.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4686–4690.
- Kohn, E.C., and Liotta, L.A. (1990). L651582: a novel antiproliferative and antimetastasis agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 54–60.
- Kohn, E.C., and Liotta, L.A. (1995). Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res.* 55, 1856–1862.
- Kohn, E.C., Sandeen, M.A., and Liotta, L.A. (1992). In vivo efficacy of a novel inhibitor of selected signal transduction pathways including calcium, arachidonate, and inositol phosphates. *Cancer Res.* 52, 3208–3212.
- Kohn, E.C., Jacobs, W., Kim, Y.S., Alessandro, R., Stetler-Stevenson, W.G., and Liotta, L.A. (1994). Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *J. Biol. Chem.* 269, 21505–21511.
- Kohn, E.C., Reed, E., Sarosy, G., Christian, M., Link, C.J., Cole, K., Figg, W.D., Davis, P.A., Jacob, J., Goldspiel, B., et al. (1996). Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. *Cancer Res.* 56, 569–573.
- Kohn, E.C., Reed, E., Sarosy, G.A., Minasian, L., Bauer, K.S., Bostick-Bruton, F., Kulpa, V., Fuse, E., Tompkins, A., Noone, M., et al. (2001). A phase I trial of carboxyamido-triazole and paclitaxel for relapsed solid tumors: potential efficacy of the combination and demonstration of pharmacokinetic interaction. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1600–1609.
- Kondo, S., Yin, D., Morimura, T., Kubo, H., Nakatsu, S., and Takeuchi, J. (1995). Combination therapy with cisplatin and nifedipine induces apoptosis in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human glioblastoma cells. *Br. J. Cancer* 71, 282–289.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375–388.

Konopleva, M., Milella, M., Ruvolo, P., Watts, J.C., Ricciardi, M.R., Korchin, B., McQueen, T., Bornmann, W., Tsao, T., Bergamo, P., et al. (2012a). MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia* 26, 778–787.

Konopleva, M., Milella, M., Ruvolo, P., Watts, J.C., Ricciardi, M.R., Korchin, B., McQueen, T., Bornmann, W., Tsao, T., Bergamo, P., et al. (2012b). MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia* 26, 778–787.

Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477–482.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.

Kuhn, E., Kurman, R.J., Vang, R., Sehdev, A.S., Han, G., Soslow, R., Wang, T.-L., and Shih, I.-M. (2012). TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *J. Pathol.* 226, 421–426.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 433–443.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am. J. Pathol.* 186, 733–747.

Labiche, A., Elie, N., Herlin, P., Denoux, Y., Crouet, H., Heutte, N., Joly, F., Héron, J.-F., Gauduchon, P., and Henry-Amar, M. (2009). Prognostic significance of tumour vascularisation on survival of patients with advanced ovarian carcinoma. *Histol. Histopathol.* 24, 425–435.

Lambert, P.A., Somers, K.D., Kohn, E.C., and Perry, R.R. (1997). Antiproliferative and antiinvasive effects of carboxyamido-triazole on breast cancer cell lines. *Surgery* 122, 372-378; discussion 378-379.

Landry Y., Gies J.P. *Pharmacologie, Des cibles vers l'indication thérapeutique.* (2003) Dunod

Lanner, J.T. (2012). Ryanodine receptor physiology and its role in disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 217–234.

Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.

Lattanzio, R., Marchisio, M., La Sorda, R., Tinari, N., Falasca, M., Alberti, S., Miscia, S., Ercolani, C., Di Benedetto, A., Perracchio, L., et al. (2013). Overexpression of activated phospholipase C $\gamma$ 1 is a risk factor for distant metastases in T1-T2, N0 breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* 132, 1022–1031.

- Lazzeri, M., Vannucchi, M.G., Spinelli, M., Bizzoco, E., Beneforti, P., Turini, D., and Faussone-Pellegrini, M.-S. (2005). Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *Eur. Urol.* *48*, 691–698.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C.L., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., et al. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *15*, 852–861.
- Leverson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., et al. (2015). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* *6*, e1590.
- Lheureux, S., N'Diaye, M., Blanc-Fournier, C., Dugué, A.E., Clarisse, B., Dutoit, S., Giffard, F., Abeilard, E., Briand, M., Labiche, A., et al. (2015). Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* *136*, E340-350.
- Li, R., Moudgil, T., Ross, H.J., and Hu, H.-M. (2005). Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ.* *12*, 292–303.
- Li, R.-J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y.G., Jia, H., and Liu, J.O. (2016). Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *ELife* *5*.
- Li, W., Shi, Q., Wang, W., Liu, J., Li, Q., and Hou, F. (2014). Calcium channel blockers and risk of breast cancer: a meta-analysis of 17 observational studies. *PloS One* *9*, e105801.
- Liu, Y., and Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* *22*, 367–376.
- Liu, L., Wu, J., and Kennedy, D.J. (2016). Regulation of Cardiac Remodeling by Cardiac Na(+)/K(+)-ATPase Isoforms. *Front. Physiol.* *7*, 382.
- Liu, Y., Xiong, Y., and Bassham, D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* *5*, 954–963.
- Liu, Y., Shoji-Kawata, S., Sumpter, R.M., Wei, Y., Ginet, V., Zhang, L., Posner, B., Tran, K.A., Green, D.R., Xavier, R.J., et al. (2013). Autosis is a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20364–20371.
- Lodola, F., Laforenza, U., Bonetti, E., Lim, D., Dragoni, S., Bottino, C., Ong, H.L., Guerra, G., Ganini, C., Massa, M., et al. (2012). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PloS One* *7*, e42541.
- Lopreato, R., Giacomello, M., and Carafoli, E. (2014). The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *J. Biol. Chem.* *289*, 10261–10268.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* *120*, 237–248.

- Lupia, M., and Cavallaro, U. (2017). Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity? *Mol. Cancer* *16*, 64.
- Ma, H., Groth, R.D., Cohen, S.M., Emery, J.F., Li, B., Hoedt, E., Zhang, G., Neubert, T.A., and Tsien, R.W. (2014).  $\gamma$ CaMKII shuttles  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell* *159*, 281–294.
- Mabuchi, S., Kuroda, H., Takahashi, R., and Sasano, T. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *137*, 173–179.
- Magpusao, A.N., Omolloh, G., Johnson, J., Gascón, J., Pecuh, M.W., and Fenteany, G. (2015). Cardiac glycoside activities link  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *ACS Chem. Biol.* *10*, 561–569.
- Maik-Rachline, G., and Seger, R. (2016). The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *25*, 1–12.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* *3*, 374–376.
- Malone, C.D., Hasan, S.M.M., Roome, R.B., Xiong, J., Furlong, M., Opferman, J.T., and Vanderluit, J.L. (2012). Mcl-1 regulates the survival of adult neural precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *49*, 439–447.
- Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D., and Rizzuto, R. (2016). Molecular structure and pathophysiological roles of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 2457–2464.
- Marchi, S., Lupini, L., Patergnani, S., Rimessi, A., Missiroli, S., Bonora, M., Bononi, A., Corrà, F., Giorgi, C., De Marchi, E., et al. (2013). Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Curr. Biol. CB* *23*, 58–63.
- Marino, J., García Vior, M.C., Furmento, V.A., Blank, V.C., Awruch, J., and Roguin, L.P. (2013). Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 2553–2562.
- Marone, M., Scambia, G., Mozzetti, S., Ferrandina, G., Iacovella, S., De Pasqua, A., Benedetti-Panici, P., and Mancuso, S. (1998). bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *4*, 517–524.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* *21*, 749–760.
- Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 177–180.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1989). Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *3*, 1843–1849.
- McConkey, D.J., Lin, Y., Nutt, L.K., Ozel, H.Z., and Newman, R.A. (2000). Cardiac glycosides stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* *60*, 3807–3812.



- Meng, Y., Tang, W., Dai, Y., Wu, X., Liu, M., Ji, Q., Ji, M., Pienta, K., Lawrence, T., and Xu, L. (2008). Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2192–2202.
- Mercan, F., Lee, H., Kolli, S., and Bennett, A.M. (2013). Novel role for SHP-2 in nutrient-responsive control of S6 kinase 1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 33, 293–306.
- Michels, J., O'Neill, J.W., Dallman, C.L., Mouzakiti, A., Habens, F., Brimmell, M., Zhang, K.Y.J., Craig, R.W., Marcusson, E.G., Johnson, P.W.M., et al. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* 23, 4818–4827.
- Michels, J., Kepp, O., Senovilla, L., Lissa, D., Castedo, M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Functions of BCL-X L at the Interface between Cell Death and Metabolism. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 705294.
- Mignen, O., Brink, C., Enfissi, A., Nadkarni, A., Shuttleworth, T.J., Giovannucci, D.R., and Capiod, T. (2005). Carboxamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J. Cell Sci.* 118, 5615–5623.
- Mikkelsen, T., Lush, R., Grossman, S.A., Carson, K.A., Fisher, J.D., Alavi, J.B., and Rosenfeld, S. (2007). Phase II clinical and pharmacologic study of radiation therapy and carboxyamido-triazole (CAI) in adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Invest. New Drugs* 25, 259–263.
- Mills, J.R., Hippo, Y., Robert, F., Chen, S.M.H., Malina, A., Lin, C.-J., Trojahn, U., Wendel, H.-G., Charest, A., Bronson, R.T., et al. (2008). mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10853–10858.
- Millward, M.J., Cantwell, B.M., Munro, N.C., Robinson, A., Corris, P.A., and Harris, A.L. (1993). Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study. *Br. J. Cancer* 67, 1031–1035.
- Mirza, M.R., Monk, B.J., Herrstedt, J., Oza, A.M., Mahner, S., Redondo, A., Fabbro, M., Ledermann, J.A., Lorusso, D., Vergote, I., et al. (2016). Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 2154–2164.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81, 151–157.
- Mojsa, B., Lassot, I., and Desagher, S. (2014). Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells* 3, 418–437.
- Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem. Sci.* 39, 101–111.
- Monaco, G., Beckers, M., Ivanova, H., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2012). Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L)-binding sites on type 1 IP(3) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 31–35.
- Monk, B.J., Poveda, A., Vergote, I., Raspagliesi, F., Fujiwara, K., Bae, D.-S., Oaknin, A., Ray-Coquard, I., Provencher, D.M., Karlan, B.Y., et al. (2014). Anti-angiopoietin therapy with trebananib for recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 799–808.

- Monteith, G.R., McAndrew, D., Faddy, H.M., and Roberts-Thomson, S.J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat. Rev. Cancer* 7, 519–530.
- Monteith, G.R., Prevarskaya, N., and Roberts-Thomson, S.J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* 17, 367–380.
- Moody, T.W., Chiles, J., Moody, E., Sieczkiewicz, G.J., and Kohn, E.C. (2003). CAI inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Lung Cancer Amst. Neth.* 39, 279–288.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133–6140.
- Murphy, A.N., Kelleher, J.K., and Fiskum, G. (1990). Submicromolar Ca<sup>2+</sup> regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 265, 10527–10534.
- Mutch, D.G., and Prat, J. (2014). 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* 133, 401–404.
- Napoli, E., Liu, S., Marsilio, I., Zarbalis, K., and Giulivi, C. (2017). Lipid-based DNA/siRNA transfection agents disrupt neuronal bioenergetics and mitophagy. *Biochem. J.*
- Nossov, V., Amneus, M., Su, F., Lang, J., Janco, J.M.T., Reddy, S.T., and Farias-Eisner, R. (2008). The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 215–223.
- Nunes, T., Bernardazzi, C., and de Souza, H.S. (2014). Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *BioMed Res. Int.* 2014, 218493.
- Oakes, S.R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M.E., Takano, E., Ward, T., et al. (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2766–2771.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* 282, 13123–13132.
- Odunsi, K., Matsuzaki, J., James, S.R., Mhawech-Fauceglia, P., Tsuji, T., Miller, A., Zhang, W., Akers, S.N., Griffiths, E.A., Miliotto, A., et al. (2014). Epigenetic potentiation of NY-ESO-1 vaccine therapy in human ovarian cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2, 37–49.
- Oh, J., Barve, M., Matthews, C.M., Koon, E.C., Heffernan, T.P., Fine, B., Grosen, E., Bergman, M.K., Fleming, E.L., DeMars, L.R., et al. (2016). Phase II study of Vigil<sup>®</sup> DNA engineered immunotherapy as maintenance in advanced stage ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 143, 504–510.
- Okamoto, Y., Ohkubo, T., Ikebe, T., and Yamazaki, J. (2012). Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 40, 1431–1440.
- Oliver, V.K., Patton, A.M., Desai, S., Lorang, D., Libutti, S.K., and Kohn, E.C. (2003). Regulation of the pro-angiogenic microenvironment by carboxyamido-triazole. *J. Cell. Physiol.* 197, 139–148.
- O’Neil, N.J., Bailey, M.L., and Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nat. Rev. Genet.*
- Opferman, J.T. (2016). Attacking cancer’s Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members. *FEBS J.* 283, 2661–2675.

- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* *426*, 671–676.
- Opydo-Chanek, M., Gonzalo, O., and Marzo, I. (2017). Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochem. Pharmacol.* *136*, 12–23.
- Osorio-Fuentealba, C., and Klip, A. (2015). Dissecting signalling by individual Akt/PKB isoforms, three steps at once. *Biochem. J.* *470*, e13-16.
- Padmanabhan, N., Kumar, B.R., Pookunju, A.P., Srinivasan, A., and Mahajan, V. (2015). Preliminary Experience and Morbidity Analysis of Cytoreductive Surgery with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (CRS/HIPEC) from a Tertiary Cancer Center in India. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* *9*, XC09-XC13.
- Pakish, J.B., Zhang, Q., Chen, Z., Liang, H., Chisholm, G.B., Yuan, Y., Mok, S.C., Broaddus, R.R., Lu, K.H., and Yates, M.S. (2017). Immune Microenvironment in Microsatellite-Unstable Endometrial Cancers: Hereditary or Sporadic Origin Matters. *Clin. Cancer Res.*
- Pan, Z., Damron, D., Nieminen, A.L., Bhat, M.B., and Ma, J. (2000). Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 19978–19984.
- Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2013). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 611–623.
- Perabo, F.G.E., Wirger, A., Kamp, S., Lindner, H., Schmidt, D.H., Müller, S.C., and Kohn, E.C. (2004). Carboxyamido-triazole (CAI), a signal transduction inhibitor induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2. *Anticancer Res.* *24*, 2869–2877.
- Perabo, F.G.E., Demant, A.W., Wirger, A., Schmidt, D.H., Sitia, M., Wardelmann, E., Müller, S.C., and Kohn, E.C. (2005). Carboxyamido-triazole (CAI) reverses the balance between proliferation and apoptosis in a rat bladder cancer model. *Anticancer Res.* *25*, 725–729.
- Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., et al. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2484–2496.
- Pétigny-Lechartier, C., Duboc, C., Jebahi, A., Louis, M.-H., Abeillard, E., Denoyelle, C., Gauduchon, P., Poulain, L., and Villedieu, M. (2017). The mTORC1/2 Inhibitor AZD8055 Strengthens the Efficiency of the MEK Inhibitor Trametinib to Reduce the Mcl-1/[Bim and Puma] ratio and to Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* *16*, 102–115.
- Petrillo, M., Nero, C., Amadio, G., Gallo, D., Fagotti, A., and Scambia, G. (2016). Targeting the hallmarks of ovarian cancer: The big picture. *Gynecol. Oncol.* *142*, 176–183.
- Pfisterer, S.G., Mauthe, M., Codogno, P., and Proikas-Cezanne, T. (2011). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase (CaMK) signaling via CaMKI and AMP-activated protein kinase contributes to the regulation of WIPI-1 at the onset of autophagy. *Mol. Pharmacol.* *80*, 1066–1075.
- Piret, J.-P., Minet, E., Cosse, J.-P., Ninane, N., Debacq, C., Raes, M., and Michiels, C. (2005). Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 9336–9344.

- Plancoulaine, B., Laurinaviciene, A., Herlin, P., Besusparis, J., Meskauskas, R., Baltrusaityte, I., Iqbal, Y., and Laurinavicius, A. (2015). A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*
- Prat, J., Belhadj, H., Berek, J., Bermudez, A., Bhatla, N., Cain, J., Denny, L., Fujiwara, K., Hacker, N., Avall-Lundqvist, E., et al. (2015). Abridged republication of FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* *36*, 367–369.
- Preuss, E., Hugle, M., Reimann, R., Schlecht, M., and Fulda, S. (2013). Pan-mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor AZD8055 primes rhabdomyosarcoma cells for ABT-737-induced apoptosis by down-regulating Mcl-1 protein. *J. Biol. Chem.* *288*, 35287–35296.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2013). Targeting Ca<sup>2+</sup> transport in cancer: close reality or long perspective? *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 225–241.
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Gray, S.R., and Luzio, J.P. (2000). The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J. Cell Biol.* *149*, 1053–1062.
- Pu, Y., Luo, K.Q., and Chang, D.C. (2002). A Ca<sup>2+</sup> signal is found upstream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *299*, 762–769.
- Pujade-Lauraine, E., Hilpert, F., Weber, B., Reuss, A., Poveda, A., Kristensen, G., Sorio, R., Vergote, I., Witteveen, P., Bamias, A., et al. (2014). Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 1302–1308.
- Putney, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* *7*, 1–12.
- Qian, W., Zhu, J., Mao, C., Liu, J., Wang, Y., Wang, Q., Liu, Y., Gao, R., Xiao, H., and Wang, J. (2014). Involvement of CaM-CaMKII-ERK in bisphenol A-induced Sertoli cell apoptosis. *Toxicology* *324*, 27–34.
- Quinn, B.A., Dash, R., Azab, B., Sarkar, S., Das, S.K., Kumar, S., Oyesanya, R.A., Dasgupta, S., Dent, P., Grant, S., et al. (2011). Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* *20*, 1397–1411.
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A.M., Malmersjö, S., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *J. Cell Biol.* *209*, 653–669.
- Ready, N., Karaseva, N.A., Orlov, S.V., Luft, A.V., Popovych, O., Holmlund, J.T., Wood, B.A., and Leopold, L. (2011). Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *6*, 781–785.
- Richard, D.J., Lena, R., Bannister, T., Blake, N., Pierceall, W.E., Carlson, N.E., Keller, C.E., Koenig, M., He, Y., Minond, D., et al. (2013). Hydroxyquinoline-derived compounds and analoguing of selective Mcl-1 inhibitors using a functional biomarker. *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 6642–6649.
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* *14*, 23–27.

- Rodland, K.D., Wersto, R.P., Hobson, S., and Kohn, E.C. (1997). Thapsigargin-induced gene expression in nonexcitable cells is dependent on calcium influx. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 281–291.
- Rokhlin, O.W., Guseva, N.V., Taghiyev, A.F., Glover, R.A., and Cohen, M.B. (2010). KN-93 inhibits androgen receptor activity and induces cell death irrespective of p53 and Akt status in prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 224–235.
- Rong, Y.-P., Barr, P., Yee, V.C., and Distelhorst, C.W. (2009). Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 971–978.
- Rosenblatt, K.A., and Thomas, D.B. (1996). Reduced risk of ovarian cancer in women with a tubal ligation or hysterectomy. The World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *5*, 933–935.
- Sagredo, A.I., Sagredo, E.A., Cappelli, C., Báez, P., Rodrigo, A.M., Blanco, C., Tapia, J.C., Echeverría, C., Cerda, O., Stutzin, A., et al. (2017). TRPM4 regulates Akt/GSK3- $\beta$  activity and enhances  $\beta$ -catenin signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. *Mol. Oncol.*
- Saito, K., Uzawa, K., Endo, Y., Kato, Y., Nakashima, D., Ogawara, K., Shiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., and Tanzawa, H. (2006). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 1 down-regulated in human oral cancer. *Oncol. Rep.* *15*, 49–55.
- Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J., et al. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* *451*, 1116–1120.
- Sale, M.J., and Cook, S.J. (2013). The BH3 mimetic ABT-263 synergizes with the MEK1/2 inhibitor selumetinib/AZD6244 to promote BIM-dependent tumour cell death and inhibit acquired resistance. *Biochem. J.* *450*, 285–294.
- Samatar, A.A., and Poulikakos, P.I. (2014). Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 928–942.
- Samejima, K., and Earnshaw, W.C. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 677–688.
- Santarpia, L., Qi, Y., Stemke-Hale, K., Wang, B., Young, E.J., Booser, D.J., Holmes, F.A., O’Shaughnessy, J., Hellerstedt, B., Pippen, J., et al. (2012). Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in different clinical subtypes of breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* *134*, 333–343.
- Schaefer, E.A.M., Stohr, S., Meister, M., Aigner, A., Gudermann, T., and Buech, T.R.H. (2013). Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 426–438.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.
- Schmidt, S., Liu, G., Liu, G., Yang, W., Honisch, S., Pantelakos, S., Stournaras, C., Höning, A., and Lang, F. (2014). Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca<sup>2+</sup> entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget* *5*, 4799–4810.

Schulze-Bergkamen, H., Ehrenberg, R., Hickmann, L., Vick, B., Urbanik, T., Schimanski, C.-C., Berger, M.-R., Schad, A., Weber, A., Heeger, S., et al. (2008). Bcl-x(L) and Myeloid cell leukaemia-1 contribute to apoptosis resistance of colorectal cancer cells. *World J. Gastroenterol.* *14*, 3829–3840.

Selvaraj, S., Sun, Y., Sukumaran, P., and Singh, B.B. (2016). Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Mol. Carcinog.* *55*, 818–831.

Sevilla, L., Zaldumbide, A., Pognonec, P., and Boulukos, K.E. (2001). Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-xL protein by Ets, Rel/NFkappaB, STAT and AP1 transcription factor families. *Histol. Histopathol.* *16*, 595–601.

Sheng, M., Thompson, M.A., and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* *252*, 1427–1430.

Shibao, K., Fiedler, M.J., Nagata, J., Minagawa, N., Hirata, K., Nakayama, Y., Iwakiri, Y., Nathanson, M.H., and Yamaguchi, K. (2010). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium* *48*, 315–323.

Shigemasa, K., Katoh, O., Shiroyama, Y., Mihara, S., Mukai, K., Nagai, N., and Ohama, K. (2002). Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* *93*, 542–550.

Shimizu, S., Shinohara, Y., and Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* *19*, 4309–4318.

Simonin, K., N'Diaye, M., Lheureux, S., Lousouarn, C., Dutoit, S., Briand, M., Giffard, F., Brotin, E., Blanc-Fournier, C., and Poulain, L. (2013). Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *18*, 492–508.

Slavov, N., Carey, J., and Linse, S. (2013). Calmodulin Transduces Ca<sup>2+</sup> Oscillations into Differential Regulation of Its Target Proteins. *ACS Chem. Neurosci.* *4*, 601–612.

Smaili, S.S., Pereira, G.J.S., Costa, M.M., Rocha, K.K., Rodrigues, L., do Carmo, L.G., Hirata, H., and Hsu, Y.-T. (2013). The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. *Curr. Mol. Med.* *13*, 252–265.

Smani, T., Shapovalov, G., Skryma, R., Prevarskaya, N., and Rosado, J.A. (2015). Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1853*, 1772–1782.

Somnay, Y., Simon, K., Harrison, A.D., Kunnimalaiyaan, S., Chen, H., and Kunnimalaiyaan, M. (2013). Neuroendocrine phenotype alteration and growth suppression through apoptosis by MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, in carcinoid cell lines in vitro. *Anticancer. Drugs* *24*, 66–72.

Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *12*, 27–41.

Sonpavde, G., Matveev, V., Burke, J.M., Caton, J.R., Fleming, M.T., Hutson, T.E., Galsky, M.D., Berry, W.R., Karlov, P., Holmlund, J.T., et al. (2012). Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *23*, 1803–1808.

- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* *19*, 202–208.
- Stateva, S.R., Salas, V., Anguita, E., Benaim, G., and Villalobo, A. (2015). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin and Apo-Calmodulin Both Bind to and Enhance the Tyrosine Kinase Activity of c-Src. *PLoS One* *10*, e0128783.
- Steinberg, S.F. (2012). Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiol. Bethesda Md* *27*, 130–139.
- Swulius, M.T., and Waxham, M.N. (2008). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 2637–2657.
- Szatkowski, C., Parys, J.B., Ouadid-Ahidouch, H., and Matifat, F. (2010). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> signalling is involved in estradiol-induced breast cancer epithelial cell growth. *Mol. Cancer* *9*, 156.
- Sznol, M., and Chen, L. (2013). Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1021–1034.
- Tanwar, J., and Motiani, R.K. (2017). Role of SOCE architects STIM and Orai proteins in Cell Death. *Cell Calcium*.
- Taylor, J.M., and Simpson, R.U. (1992). Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer Res.* *52*, 2413–2418.
- Tomida, T., Hirose, K., Takizawa, A., Shibasaki, F., and Iino, M. (2003). NFAT functions as a working memory of Ca<sup>2+</sup> signals in decoding Ca<sup>2+</sup> oscillation. *EMBO J.* *22*, 3825–3832.
- Tosatto, A., Sommaggio, R., Kummerow, C., Bentham, R.B., Blacker, T.S., Berecz, T., Duchon, M.R., Rosato, A., Bogeski, I., Szabadkai, G., et al. (2016). The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1 $\alpha$ . *EMBO Mol. Med.* *8*, 569–585.
- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1985). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* *315*, 340–343.
- Tsunoda, T., Koga, H., Yokomizo, A., Tatsugami, K., Eto, M., Inokuchi, J., Hirata, A., Masuda, K., Okumura, K., and Naito, S. (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor type1 (IP<sub>3</sub>R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene* *24*, 1396–1402.
- Uehling, D.E., and Harris, P.A. (2015). Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *25*, 4047–4056.
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.-P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., and Abramson, J. (2008). The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17742–17747.
- Vaeth, M., Maus, M., Klein-Hessling, S., Freinkman, E., Yang, J., Eckstein, M., Cameron, S., Turvey, S.E., Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., et al. (2017). Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming. *Immunity* *47*, 664–679.e6.

- Vandenberg, C.J., and Cory, S. (2013). ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 121, 2285–2288.
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., and Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 195–203.
- Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2016). Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene* 35, 5079–5092.
- Villedieu, M., Louis, M.-H., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* 105, 31–44.
- Wacheck, V., Cejka, D., Sieghart, W., Losert, D., Strommer, S., Crevenna, R., Monia, B.P., and Selzer, E. (2006). Mcl-1 is a relevant molecular target for antisense oligonucleotide strategies in gastric cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1348–1354.
- van der Walt, S., Schönberger, J.L., Nunez-Iglesias, J., Boulogne, F., Warner, J.D., Yager, N., Gouillart, E., Yu, T., and scikit-image contributors (2014). scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* 2, e453.
- Wang, J.-M., Lai, M.-Z., and Yang-Yen, H.-F. (2003). Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1896–1909.
- Wang, Q., Guo, W., Hao, B., Shi, X., Lu, Y., Wong, C.W.M., Ma, V.W.S., Yip, T.T.C., Au, J.S.K., Hao, Q., et al. (2016). Mechanistic study of TRPM2-Ca<sup>2+</sup>-CAMK2-BECN1 signaling in oxidative stress-induced autophagy inhibition. *Autophagy* 12, 1340–1354.
- Wang, S.Q., Lakatta, E.G., Cheng, H., and Zhou, Z.Q. (2002). Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *J. Exp. Biol.* 205, 2957–2962.
- Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., Schuetz, J.D., Rehg, J.E., and Opferman, J.T. (2013). Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes Dev.* 27, 1351–1364.
- Wang, Y., Zhao, R., and Zhe, H. (2015). The emerging role of CaMKII in cancer. *Oncotarget* 6, 11725–11734.
- Wang, Y., He, J., Zhang, S., and Yang, Q. (2017). Intracellular calcium promotes radioresistance of non-small cell lung cancer A549 cells through activating Akt signaling. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 39, 1010428317695970.
- Wasilenko, W.J., Palad, A.J., Somers, K.D., Blackmore, P.F., Kohn, E.C., Rhim, J.S., Wright, G.L., and Schellhammer, P.F. (1996). Effects of the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole on the proliferation and invasiveness of human prostate tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 68, 259–264.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays Biochem.* 59, 43–69.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.-S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457, 901–905.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.



- Weidinger, C., Shaw, P.J., and Feske, S. (2013). STIM1 and STIM2-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates antitumour immunity by CD8(+) T cells. *EMBO Mol. Med.* 5, 1311–1321.
- Weiss, N., and De Waard, M. (2006). [Voltage-dependent calcium channels at the heart of pain perception]. *Med. Sci.* MS 22, 396–404.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* 4, 295–305.
- Williams, J., Lucas, P.C., Griffith, K.A., Choi, M., Fogoros, S., Hu, Y.Y., and Liu, J.R. (2005). Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol. Oncol.* 96, 287–295.
- Winters, M.E., Mehta, A.I., Petricoin, E.F., Kohn, E.C., and Liotta, L.A. (2005). Supra-additive growth inhibition by a celecoxib analogue and carboxyamido-triazole is primarily mediated through apoptosis. *Cancer Res.* 65, 3853–3860.
- Wong, R., Turlova, E., Feng, Z.-P., Rutka, J.T., and Sun, H.-S. (2017). Activation of TRPM7 by naltriben enhances migration and invasion of glioblastoma cells. *Oncotarget* 8, 11239–11248.
- Wood, D.E., and Newcomb, E.W. (2000). Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp. Cell Res.* 256, 375–382.
- Wu, Y., Palad, A.J., Wasilenko, W.J., Blackmore, P.F., Pincus, W.A., Schechter, G.L., Spoonster, J.R., Kohn, E.C., and Somers, K.D. (1997). Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 1915–1921.
- Wuillème-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Amiot, M., and Bataille, R. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 19, 1248–1252.
- Xu, Y., Zhang, S., Niu, H., Ye, Y., Hu, F., Chen, S., Li, X., Luo, X., Jiang, S., Liu, Y., et al. (2015). STIM1 accelerates cell senescence in a remodeled microenvironment but enhances the epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *Sci. Rep.* 5, 11754.
- Xu, Z., Xu, W., Song, Y., Zhang, B., Li, F., and Liu, Y. (2016). Blockade of store-operated calcium entry alleviates high glucose-induced neurotoxicity via inhibiting apoptosis in rat neurons. *Chem. Biol. Interact.* 254, 63–72.
- Yang, J., Song, X., Chen, Y., Lu, X., Fu, Y., and Luo, Y. (2014). PLC $\gamma$ 1-PKC $\gamma$  signaling-mediated Hsp90 $\alpha$  plasma membrane translocation facilitates tumor metastasis. *Traffic Cph. Den.* 15, 861–878.
- Yang, J., Yu, J., Li, D., Yu, S., Ke, J., Wang, L., Wang, Y., Qiu, Y., Gao, X., Zhang, J., et al. (2017). Store-operated calcium entry-activated autophagy protects EPC proliferation via the CAMKK2-MTOR pathway in ox-LDL exposure. *Autophagy* 13, 82–98.
- Yang, S.L., Cao, Q., Zhou, K.C., Feng, Y.J., and Wang, Y.Z. (2009). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28, 1320–1328.
- Yeung, P.S.-W., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2017). Pore opening mechanism of CRAC channels. *Cell Calcium* 63, 14–19.

- Yoshida, J., Ishibashi, T., and Nishio, M. (2003). Antiproliferative effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Eur. J. Pharmacol.* *472*, 23–31.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2009). Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* *5*, 720–722.
- Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A.D., Xie, X., Ma, D., et al. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19023–19028.
- Zhang, S.-S., Wen, J., Yang, F., Cai, X.-L., Yang, H., Luo, K.-J., Liu, Q.W., Hu, R.-G., Xie, X., Huang, Q.-Y., et al. (2013). High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *30*, 607.
- Zhang, W., Ruvolo, V.R., Gao, C., Zhou, L., Bornmann, W., Tsao, T., Schober, W.D., Smith, P., Guichard, S., Konopleva, M., et al. (2014). Evaluation of apoptosis induction by concomitant inhibition of MEK, mTOR, and Bcl-2 in human acute myelogenous leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 1848–1859.
- Zhang, W.-M., Zhou, J., and Ye, Q.-J. (2008). Endothelin-1 enhances proliferation of lung cancer cells by increasing intracellular free Ca<sup>2+</sup>. *Life Sci.* *82*, 764–771.
- Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfschuhle, J., Gallagher, I., Koepfel, A.F., Hatef, S., Papanicolas, C., et al. (2017). Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Res.* *77*, 3479–3490.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085–1095.
- Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* *278*, 403–413.
- Zhou, X., Lin, D.S., Zheng, F., Sutton, M.A., and Wang, H. (2010). Intracellular calcium and calmodulin link brain-derived neurotrophic factor to p70S6 kinase phosphorylation and dendritic protein synthesis. *J. Neurosci. Res.* *88*, 1420–1432.
- Zhuang, L., Peng, J.-B., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R.M., Hediger, M.A., and Freeman, M.R. (2002). Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 1755–1764.

# Résumé

---

Les cancers de l'ovaire représentent la première cause de décès par cancer gynécologique. L'échec des traitements, lié à l'apparition d'une chimiorésistance, implique de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce cadre, le laboratoire a mis en évidence la coopération de deux molécules anti-apoptotiques surexprimées dans les cancers de l'ovaire, Mcl-1 et Bcl-x<sub>L</sub>, qui empêchent alors le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. L'inhibition de ces cibles est alors mise en place. Un BH3-mimétique inhibiteur de Bcl-x<sub>L</sub> a été développé par la société Abbvie, l'ABT-737, qui possède un dérivé administrable par voie orale l'ABT-263 en essai clinique. En revanche, aucun inhibiteur de Mcl-1 n'est actuellement en clinique. L'inhibition de cet anti-apoptotique est donc l'un des objectifs du laboratoire. Sachant que Mcl-1 est extrêmement régulée, que l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR conduit à l'inhibition de cet anti-apoptotique, et que le calcium est capable de moduler cette voie, nous nous sommes demandés si la modulation des flux calciques permettait l'inhibition de Mcl-1 dans nos cellules. Ces travaux de thèse ont pu montrer dans un premier temps que la chélation calcique par le BAPTA-AM permettait d'inhiber Mcl-1 *via* la voie mTORC1 et de sensibiliser les cellules à l'ABT-737. Dans un second temps, l'étude de l'effet d'un inhibiteur des flux calciques en essais cliniques, le carboxyamidotriazole a permis de mettre en évidence que l'inhibition des canaux calciques capacitifs pouvait entraîner l'inhibition de Mcl-1 de nouveau en inhibant mTORC1 et induire la mort cellulaire en combinaison avec l'ABT-737. Enfin des observations morphologiques ont montré que le CAI induisait un changement morphologique aboutissant à la mort des cellules. Ce type de mort semble être lié à une perturbation du métabolisme des cellules cancéreuses IGROV1-R10 et se rapprocherait d'une mort récemment décrite dans la littérature : l'autosis.

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecological cancer. There is an urgent need to find new therapeutic strategies due to failure of treatments associated to development of chemoresistance. In this context, the laboratory has shown the cooperation of two anti-apoptotic proteins overexpressed in ovarian cancer, Mcl-1 and Bcl-x<sub>L</sub>, for preventing apoptotic cell death. ABT-737, a Bcl-x<sub>L</sub> inhibitor BH3-mimetic, was developed by Abbvie and has a clinically derivative named ABT-263. In contrast, no Mcl-1 inhibitor is currently available in clinic. The inhibition of this anti-apoptotic protein is therefore one of the objectives of the laboratory. Since inhibition of PI3K / Akt / mTOR signaling pathway leads to inhibition of Mcl-1 expression and calcium is able to modulate this pathway, we wondered if the modulation of calcium fluxes allowed the inhibition of Mcl-1 in ovarian cancer cells. First we were able to show that calcium chelation by BAPTA-AM allowed to inhibit Mcl-1 expression via mTORC1 pathway and to sensitize the cells to ABT-737. In a second step, we investigated the effect of an inhibitor of calcium fluxes that is evaluated in clinical studies, carboxyamidotriazole. We show that the inhibition of capacitive calcium channels could lead to Mcl-1 down-expression via inhibition of mTORC1 and promote apoptosis in combination with ABT-737. Finally, we observed that CAI induces a morphological change resulting in cell death. This type of death seems to be related to disruption of metabolism in IGROV1-R10 cancer cells and would be close to a cell death recently described in the literature: autosis.

Mots clés : cancer de l'ovaire, apoptose, Mcl-1, calcium, carboxyamidotriazole, canaux calciques capacitifs, autosis