

Financement obtenu du Ministère pour une thèse cancer / lipides/calcium qui débutera en Octobre 2020.

**Année 2019-2020 - Demande d'allocation doctorale  
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

**1. Informations administratives :**

Nom du directeur de thèse : [POTIER-CARTEREAU Marie](#)

Co-directeur de thèse (éventuellement) : [Mohamed TREBAK](#)

Unité, Equipe (*si unité multi-équipes*): INSERM UMR 1069 Nutrition Croissance et Cancer

Filière de rattachement : A

Email de l'encadrant : [marie.potier-cartereau@univ-tours.fr](mailto:marie.potier-cartereau@univ-tours.fr)

Co-encadrant (non HDR) éventuel (NB : limité à un seul co-encadrant(e) et à deux en cas de co-direction de thèse) : Caroline Goupille

**2. Titre de la thèse :** Rôle des canaux calciques dans la prolifération/migration et chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes : régulation par le microenvironnement ascitique.

**3. Mots-clés :** Lipides et cytokines de l'ascite, cancer ovarien séreux de haut grade, canaux calciques Orais et TRPs, signalisation calcique.

**4. Résumé :**

Il est maintenant admis que la signalisation calcique est dérégulée dans le cancer [1]. Cette signalisation calcique est contrôlée par des canaux calciques dont nous avons documenté le rôle activateur dans la migration des cellules cancéreuses et dans la formation de métastases. Plus précisément, nous avons identifié dans les cellules cancéreuses du sein, de la prostate et du côlon, des canaux calciques Orai (Orai1) avec son partenaire réticulaire STIM1 et/ou TRP (Transient Receptor Potential TRPC1 et TRPV2) qui sont sensibles aux lipides et qui régulent l'entrée de  $Ca^{2+}$  favorisant la migration cellulaire et le développement de métastases [3, 4]. **Alors que les canaux calciques sont des cibles thérapeutiques encore peu explorées dans le cancer de l'ovaire, comprendre leur régulation dans les cellules cancéreuses et leur rôle comme interlocuteur potentiel avec le microenvironnement de l'ascite constitue un challenge capital pour la mise au point de futurs traitements.**

Dans le cancer épithélial de l'ovaire, le sous-type le plus fréquent est le séreux de haut grade avec 75% des patientes qui sont diagnostiquées à un stade avancé (III et IV). Cette détection tardive est en partie responsable du faible taux de survie de 20-30% de ces patientes à 5 ans. Le cancer ovarien à stade avancé est caractérisé par un envahissement du péritoine (70% des patientes) associé à un épanchement liquidien dans la cavité péritonéale appelé ascite. L'analyse des ascites a montré l'importance du microenvironnement lipidique et cytokinique avec des concentrations élevées de lipides bioactifs comme le LPA (acide lysophosphatidique  $\approx 10 \mu\text{M}$ ) ou l'AA (acide arachidonique jusqu'à  $30\mu\text{M}$ ) et de cytokines telles IL-6 ( $\approx 5\text{ng/ml}$ ), IL-10 ( $\approx 0.03\text{ng/ml}$ ), TGF- $\beta$  ( $\approx 15\text{ng/ml}$ ) qui sont corrélés à une diminution de la survie sans progression [2,8]. Notre hypothèse est que ces médiateurs lipidique et protéique sécrétés dans l'ascite pourraient jouer un rôle promoteur du cancer de l'ovaire, en régulant la signalisation

calcique des cellules tumorales. La modulation de la signalisation calcique, de l'activité ou l'expression de canaux calciques (Orai/STIM, TRPC/V) par le LPA et l'AA ou par les cytokines précédemment citées constitue le cœur de ce projet.

**Les objectifs seront de :**

- 1) Identifier, dans les cellules cancéreuses ovariennes, les acteurs contrôlant les voies d'entrée du calcium (SOCE, constitutive et ARC) en se focalisant sur les canaux Orai et TRPs et étudier leurs rôles dans la biologie des cellules cancéreuses ovariennes (prolifération, migration/invasion cellulaire et la résistance aux agents de chimiothérapie).**
- 2) Etudier les effets directs du LPA, de l'AA et des cytokines (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ) sur l'expression et l'activité des canaux calciques et les conséquences sur la régulation de la signalisation calcique et la biologie des cellules cancéreuses ovariennes.**

## **5. Thématique, Domaine, Objectifs, Contexte, Méthode, Résultats attendus et Références bibliographiques**

Thématique: Canaux ioniques et Cancer de l'ovaire

Domaine: Physiopathologie

Objectifs

L'objectif global du projet est d'identifier les canaux calciques et de caractériser leur rôle dans la signalisation calcique et la biologie des cellules épithéliales cancéreuses ovariennes de haut grade et d'étudier les effets de la composante lipidique et cytokinique du microenvironnement ascitique sur ces canaux. Pour ce projet, nous focaliserons notre étude sur le rôle de lipides bioactifs de l'ascite, le LPA et l'AA comme acteurs susceptibles de moduler l'activité et/ou l'expression des canaux  $Ca^{2+}$  (Orai et TRP) contrôlant la signalisation calcique et pouvant moduler la progression tumorale et la résistance aux traitements. Nous étudierons également l'effet de ces lipides sur la réponse biologique des cellules de cancer de l'ovaire à des cytokines (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ).

Contexte

Le cancer de l'ovaire est le cancer le plus meurtrier parmi les cancers gynécologiques. Alors que la survie est de plus de 90 % à 5 ans pour les stades I précoces, le pronostic est sombre pour les stades avancés III et IV (carcinome séreux de haut grade) avec une survie à 5 ans qui est évaluée à 20-30%. Le cancer ovarien à stade avancé est caractérisé par un envahissement du péritoine associé, dans 30% de cas, à un épanchement liquidien dans la cavité péritonéale appelé « ascite ». Les lipides bioactifs (LPA et AA) et les cytokines (en particulier IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ) représentent une part importante des molécules présentes dans le liquide d'ascite [5-8]. **Malgré une implication des canaux Oraï et TRPs et de la signalisation calcique dans plusieurs cancers tels que le cancer du côlon, du sein et la prostate [3, 4] aucune étude n'a décrit leurs rôles dans la réponse au microenvironnement lipidique et cytokinique dans les cancers épithéliaux ovariens séreux de haut grade. En particulier, la signature calcique induite par le LPA et l'AA ou certaines cytokines et pouvant moduler le processus tumoral n'a jamais été mise en évidence [9].** Nos résultats préliminaires montrent un effet important du LPA sur l'entrée de calcium activée par la vidange du réticulum endoplasmique (SOCE) via son récepteur LPAR1

Méthode

-Lignées cellulaires : nous utiliserons 4 lignées de cellules épithéliales cancéreuses de type séreux : les cellules COV504 (séreux de haut grade), Igrov1 (séreux grade 2) et Hey8 (séreux

de haut grade), OVCAR3 (séreux de haut grade). Nous utiliserons aussi une lignée chimiorésistante SKOV3 (résistante aux sels de platine et à la doxorubicine).

-Caractérisation des influx calciques de type SOCE, ARC et constitutif (spectrofluorimétrie et imagerie calcique) et identification des canaux impliqués par stratégie de siRNA.

Etude de l'influence des lipides LPA et AA ainsi que des cytokines IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  (en association ou non) sur l'entrée de calcium.

-Caractérisation du profil d'expression des canaux par western blot et Q-PCR

-Tests biologiques +/- LPA ou AA +/-, IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ : migration/invasion cellulaire, viabilité cellulaire/ prolifération/ chimiorésistance.

-Activité des canaux calciques CRAC: patch clamp chez Mohamed Trebak

### Résultats Attendus

Si à ce jour, il n'y a que très peu de données montrant le rôle des canaux ioniques contrôlant la signalisation calcique dans le développement du cancer de l'ovaire de haut grade et aucune ne s'est intéressée à l'influence du microenvironnement ascitique sur les canaux calciques. **Ce projet devrait permettre d'identifier des signatures calciques du cancer de l'ovaire, signatures contrôlées par le microenvironnement tumoral particulier qui existe dans le cancer de l'ovaire** avec des lipides bioactifs (LPA et AA) retrouvés en grande quantité et des cytokines (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ ) décrits comme des facteurs de mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire. Notre hypothèse est que ces lipides bioactifs directement ou en association avec les cytokines libérées dans l'ascite entraîneraient des perturbations de l'équilibre dynamique des voies d'entrées du calcium dans les cellules cancéreuses ovariennes favorisant l'émergence d'un phénotype cancéreux agressif et chimiorésistant.

### Bibliographie

1. Monteith, Gregory R *et al.* The calcium-cancer signalling nexus. *Nature reviews. Cancer* vol. 17,6 (2017): 367-380.
2. Reinartz S *et al.* (2016) A transcriptome-based global map of signaling pathways in the ovarian cancer microenvironment associated with clinical outcome. *Genome Biology* 17 :108.
3. Chantome A, *et al.*, (2013) Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res*, 73, 4852-61.
4. Gueguinou M, *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.
5. Xu Y, *et al.*, (1995) Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1, 1223-32.
6. Li YY, *et al.*, (2015) Plasma levels of lysophosphatidic acid in ovarian cancer versus controls: a meta-analysis. *Lipids Health Dis*, 14, 72.
7. Li H, *et al.*, (2009) Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice. *Mol Cancer Ther*, 8, 1692-701.
8. Reinartz S, *et al.*, (2019) Cell type-selective pathways and clinical associations of lysophosphatidic acid biosynthesis and signaling in the ovarian cancer microenvironment. *Mol Oncol*, 13, 185-201.
9. Kouba S, *et al.*, (2019) Lipid metabolism and Calcium signaling in epithelial ovarian cancer. *Cell Calcium*, 81, 38-50.

### **6. Title, key words and abstract in english :**

Role of calcium channels in the proliferation/migration and chemo-resistance of ovarian cancer cells: regulation by ascitic microenvironment.

Key words: Ascite cytokines and lipids, High-Grade Serous Ovarian Cancer, Orai/TRP calcium channels, calcium signaling.

It is now accepted that calcium signaling is deregulated in cancer [1]. This calcium signaling is controlled by calcium channels whose activating role in the migration of cancer cells and in the formation of metastases has been documented. More precisely, we have identified in breast, prostate and colon cancer cells, calcium channels Orai (Orai1) with its reticular partner STIM1 and/or TRP (Transient Receptor Potential TRPC1 and TRPV2) which are sensitive to lipids and which regulate the entry of  $Ca^{2+}$  and promote cell migration and metastasis development [3, 4]. While  $Ca^{2+}$  channels are therapeutic targets that have not yet been widely explored in ovarian cancer, understanding their regulation in cancer cells and their role as a potential interlocutor with the microenvironment of ascite is a major challenge for the development of future treatments.

In epithelial ovarian cancer, the most common subtype is high-grade serous with 75% of patients diagnosed at an advanced stage (III and IV). This late detection is partly responsible for the low survival rate of 20-30% of these patients at 5 years. Advanced ovarian cancer is characterized by a peritoneal invasion (70% of patients) associated with fluid effusion into the peritoneal cavity called ascite (30% of patients). The analysis of ascite fluid showed the importance of lipid and cytokinic microenvironment with high concentrations of bioactive lipids such as LPA (lysophosphatidic acid  $\approx 10 \mu\text{M}$ ) or AA (arachidonic acid up to  $30\mu\text{M}$ ) and cytokines such as IL-6 ( $\approx 6\text{ng/ml}$ ), IL-10 ( $\approx 0.03\text{ng/ml}$ ), TGF- $\beta$  ( $15\text{ng/ml}$ ) which are correlated with decreased progression-free survival [2, 8]. Our hypothesis is that these lipid and protein mediators secreted in ascite could play a role in promoting ovarian cancer by regulating calcium signaling in tumor cells. The modulation of calcium signaling, activity or expression of calcium channels (Orai/STIM, TRPC/V) by LPA and AA or by the cytokines mentioned above is the core of this project.

**The objectives will be to:**

**1) Identify, in ovarian cancer cells, the actors involving in the calcium pathways (SOCE, constitutive and ARC) by focusing on the Orais and TRPs channels and study their roles in the biology of ovarian cancer cells (proliferation, cell migration/invasion and resistance to chemotherapy agents).**

**2) Study the direct effects of LPA, AA and cytokines (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  on the expression and activity of calcium channels and the consequences on the regulation of calcium signaling and the biology of ovarian cancer cells.**

**7. Thèses encadrées au cours des 4 dernières années (par l'encadrant et l'éventuel co-encadrant) :**

Nom du doctorant : [GUEGUINOU](#)

Encadrant responsable de la thèse : [POTIER-CARTEREAU](#)

Date de début - date de soutenance : [Décembre 2012-Décembre 2015](#)

Financement de la thèse : [APR IR Région centre Val de Loire](#)

Publications du doctorant :

[2 articles en 1<sup>er</sup> auteur \(Oncogene 2017, Oncotarget 2016\),](#)

1 en co-premier auteur (Sci Rep 2017)

2 revues en 1<sup>er</sup> auteur (BBA 2014 et 2015)

Brevets : 1

Devenir du doctorant après la thèse : Chercheur contractuel Equipe PATCH, Tours

## 8. Thèses en cours (par le directeur de thèse et l'éventuel co-directeur) :

Nom du doctorant : **KOUBA Sana**

Encadrant responsable de la thèse : **POTIER-CARTEREAU (60%) et Mohamed TREBAK (40%)**

Date de début - date de soutenance : **Octobre 2016 -Avril 2020**

Financement de la thèse : **Université**

Publications du doctorant :

1 revue en 1<sup>er</sup> auteur (Cell Calcium, 2019)

1 article en 1<sup>er</sup> auteur (European J. Med. Chem., 2019)

Brevets : **NA**

## 9. Cinq publications principales ou brevets de l'encadrant (et de l'éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :

### Marie Potier-Cartereau

-Sana Kouba, Julien Braire, Romain Félix, Aurélie Chantôme, Paul-Alain Jaffrès, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Xuexin Zhang, **Mohamed Trebak**, Christophe Vandier, Monique Mathé-Allainmat and **Marie Potier-Cartereau**. Lipidic alkaloids as SK3 channel modulators. Synthesis and biological evaluation of 2- substituted tetrahydropyridine derivatives with potential anti-metastatic activity. *European J. Med. Chem* 2019 sous presse.

-Kouba S, Ouldamer L, Garcia C, Fontaine D, Chantome A, Vandier C, Goupille C, **Potier-Cartereau M**. Lipid metabolism and Calcium signaling in epithelial ovarian cancer. *Cell Calcium*. 2019 Jul;81:38-50.

-Rua C, Guéguinou M, Soubai I, Viel E, **Potier-Cartereau M**, Chantome A, Barbe C, Bougnoux P, Barin-Le Guellec C, Vandier C. SK3 Gene Polymorphism Is Associated with Taxane Neurotoxicity and Cell Calcium Homeostasis. *Clin Cancer Res*. 2018 Jul 23.

-Gueguinou M, Crottès D, Chantôme A, Rapetti-Mauss R, **Potier-Cartereau M**, Clarysse L, Girault A, Fourbon Y, Jézéquel P, Guérin-Charbonnel C, Fromont G, Martin P, Pellissier B, Schiappa R, Chamorey E, Mignen O, Uguen A, Borgese F, Vandier C, Soriani O. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Oncogene*. 2017 Jun 22;36(25):3640-3647

-Guéguinou M, Harnois T, Crottès D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, Chantôme A, Haelters JP, Jaffrès PA, Jourdan ML, Weber G, Soriani O, Bougnoux P, Mignen O, Bourmeyster N, Constantin B, Lecomte T, Vandier C, **Potier-Cartereau M**. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36168-36184.

### Mohamed Trebak

-Zhang X, Pathak T, Yoast R, Emrich S, Xin P, Nwokonko RM, Johnson M, Wu S, Delierneux C, Gueguinou M, Hempel N, Putney JW Jr, Gill DL, **Trebak M**. A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. *Nat Commun*. 2019 Apr 29;10(1):1971.

-Liu Z, Wei Y, Zhang L, Yee PP, Johnson M, Zhang X, Gulley M, Atkinson JM, **Trebak M**, Wang HG, Li W. Induction of store-operated calcium entry (SOCE) suppresses glioblastoma growth by inhibiting the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ. *Oncogene*. 2019 Jan;38(1):120-139.

-**Trebak M**, Kinet JP. Calcium signalling in T cells. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(3):154–169.

- Emrich SM, Yeast RE, Xin P, Zhang X, Pathak T, Nwokonko R, Gueguinou MF, Subedi KP, Zhou Y, Ambudkar IS, Hempel N, Machaca K, Gill DL, **Trebak M**. Cross-talk between N-terminal and C-terminal domains in stromal interaction molecule 2 (STIM2) determines enhanced STIM2 sensitivity. *J Biol Chem.* 2019 Apr 19;294(16):6318-6332..

- Zhou Y, Nwokonko RM, Cai X, Loktionova NA, Abdulqadir R, Xin P, Niemeyer BA, Wang Y, **Trebak M**, Gill DL. Cross-linking of Orai1 channels by STIM proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Apr 10;115(15):E3398-E3407.

## 10. Principaux contrats de recherche obtenus par l'encadrant (et l'éventuel co-encadrant) au cours des 4 dernières années :

2019-2020 : Ligue Contre la Cancer CCIRGO Partenaire (15k€)

2018-2021: APR-IR LIPICAbs PI (200 k€)

2018 : AO Structurant du CGO Partenaire (17.5K€)

2017-2018 : Ligue Contre la Cancer PI (25k€)

2017-2018 : Actions de recherches collaboratives Tours Poitiers PI (10k€)

2015-2016 : Ligue Contre la Cancer CCIRGO Partenaire (10k€)

## 11. Autres thèses en cours au sein de l'équipe (limité à l'équipe d'appartenance du demandeur si unité pluri-équipes):

Nombre d'HDR dans l'équipe	<b>15 HDR</b>			
Détail des étudiants en thèse dans l'équipe (Nom des encadrants et calendrier de ces thèses)	Nom étudiant	Dates : début et fin de thèse	Nom de l'encadrant (en gras) et éventuel co-encadrant (entre parenthèses)	Financement de la thèse
	Fanny Berry	2018-2021	<b>Gaëlle Fromont</b> (Karine Mahéo)	Université
	Sana Kouba	2016-2020 (mars)	<b>Marie Potier</b> (Mohamed Trebak, USA)	Université
	Marion Papin	2019-2022	<b>Christophe Vandier</b> (Aurélie Chantôme)	Université
	Delphine Fontaine	2016-2020 (mars)	<b>Christophe Vandier</b> (Aurélie Chantôme)	Projet Région Centre
	Nastaran Ahmadvour	2017-2020 (mars)	<b>Jean-François Dumas</b> (Karine Mahéo)	Université

## 12. Remarques éventuelles à signaler :

xxx