



**HAL**  
open science

## Régulation de l'expression de KCNN1 par EWS-FLI1

Jérôme Amiaud

► **To cite this version:**

Jérôme Amiaud. Régulation de l'expression de KCNN1 par EWS-FLI1 : rôle dans le développement du sarcome d'Ewing. Biologie moléculaire. 2021. hal-03166307

**HAL Id: hal-03166307**

**<https://ephe.hal.science/hal-03166307>**

Submitted on 11 Mar 2021

**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.



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

par

**Jérôme AMIAUD**

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études en Sciences de la Vie  
et de la Terre

**Régulation de l'expression de *KCNN1* par *EWS-FLI1* : rôle dans le développement du  
sarcome d'Ewing**

Soutenu le 18 février 2021,

devant le jury suivant :

**Dr Dominique BLUTEAU** - Présidente de Jury

**Dr Gaëlle PIERRON** - Rapporteur

**Pr Christophe VANDIER** - Examineur

**Dr Franck VERRECCHIA** - Tuteur scientifique

**Dr Betty GARDIE** - Tutrice pédagogique

Laboratoire Sarcome Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés (Phy-Os)

Unité INSERM UMR\_1238

Directrice : Dr Françoise REDINI



*Un bonheur que rien n'a entamé succombe à la moindre atteinte ; mais quand on doit se battre contre les difficultés incessantes, on s'aguerrit dans l'épreuve, on résiste à n'importe quels maux, et même si l'on trébuche, on lutte encore à genoux*

**Sénèque**, la vie heureuse

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement le Dr Gaëlle PIERRON pour avoir accepté d'être rapportrice de mon Diplôme de l'EPHE ainsi que les Dr Dominique BLUTEAU et Dr Christophe VANDIER pour avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance, et de venir critiquer mon travail, ainsi que pour l'intérêt que vous y avez porté.

Je souhaite également remercier ma tutrice pédagogique, Betty GARDIE. Merci pour le temps que tu m'as consacré dans le choix de mes UEs, ton accompagnement permanent dans les démarches administratives, et puis surtout ta bienveillance durant ces 3 années, malgré les inquiétudes que je t'ai fait subir. Tu as toujours été présente lors des points d'étape, des bilans de fin d'année, durant les unités d'enseignements où tu devenais, alors, mon enseignante. Si je ne te l'ai jamais dit, redevenir étudiant dans de telles conditions à 40 ans c'est un immense plaisir. Enfin, je te suis profondément reconnaissant pour tes remarques et tes conseils qui ont contribué à l'amélioration de tout ce travail de Diplôme.

Je souhaite adresser mes remerciements bien évidemment à mon tuteur scientifique, Franck VERRECCHIA. En 2016, à l'aube d'une nouvelle ère tu avais accepté de devenir mon encadrant au cours de la dernière étape de mon dossier de VAE. Ta passion, ta pédagogie (qui d'autre peut se vanter d'avoir un Directeur de Recherche si souvent à la paillasse ?), et ton éternel soif d'apprendre ont fait le reste. Après quelques mois de réflexion sur mon envie de poursuivre ma progression, tu as accepté de m'accompagner dans ma démarche. Tu m'as emmené avec Toi, tu m'as poussé dans mes retranchements, tu m'as écouté, et tu m'as transmis, tellement. Grâce à Toi j'ai évolué, et je sais plus que jamais ce qui m'anime. J'ose espérer pouvoir un jour pouvoir transmettre tout ce que tu m'as apporté.

Je tiens aussi à remercier Céline Charrier, Séverine Battaglia, et Frédéric Lézot (mon PPD). : Depuis 2010 et mon arrivée au laboratoire L.P.R.O devenu Phy.Os en 2017, j'ai toujours autant de plaisir à travailler à vos côtés. Céline je suis tellement heureux d'avancer en binôme dans la gestion de notre pôle de compétence en histotechnologie. Avec Franck vous avez su m'apaiser, et ce n'était pas gagné. L'arrivée récente de Rose-Anne nous permet d'entrevoir un bel avenir en Equipe.

Je souhaite remercier les membres du laboratoire avec lesquels j'ai tellement de plaisir à travailler, et plus particulièrement : Mathilde Mullard, Maryne Dupuy, Sarah Renault, et Vincent Crenn. Merci aux étudiants d'être de véritables moteurs au quotidien. La force de l'avenir c'est la jeunesse d'aujourd'hui.

J'adresse mes remerciements à Sandy et Audrey qui ont été présentes lors de mes cours sur Paris. Nos échanges, parfois légers, ont contribué à faire de ces semaines de cours des moments de partage, d'écoute et d'enrichissement professionnel et personnel.

Merci également aux personnels de l'EPHE : responsable de diplôme, membre du conseil de perfectionnement, et personnels administratifs. Vous avez toutes et tous contribué, à un moment donné, à la réussite de ce parcours.

Il serait donc réducteur de m'attribuer l'aboutissement de ce travail. Sans de nombreuses personnes, celui-ci n'aurait été possible. Sans ma Famille, je ne serais rien.

Je souhaite donc remercier du plus profond de mon cœur mes Parents qui m'ont permis en conjuguant vie professionnelle, et vie personnelle, de suivre sereinement mes semaines de cours et surtout d'être présent chaque mercredi pour mener mon projet au mieux. Merci aussi de m'avoir un jour emmené au Musée Océanographique de Monaco, en 1985, puis d'avoir permis ce stage en 1994 au laboratoire de biologie marine de Penn-Avel au Croisic. J'ai eu cette chance de comprendre ce qui m'animait, très jeune.

Et puis il y a ma Famille, mes Enfants, ma Femme. Merci à tous les 4, Anne-Laure, Ombeline, Maxence, et Antoine d'être là chaque jour. Je suis conscient d'être quelqu'un de particulier, mais ce dont je suis sûr, c'est que sans Vous je n'aurais jamais eu le courage d'entreprendre ce travail. J'ai ce besoin viscéral de tout donner pour Vous.

Anne-Laure, Le 25 janvier 2000 tu es rentrée par une petite porte pour chambouler ma Vie à tout jamais. Tu as choisi d'accepter de partager un Chemin à mes côtés. Rien n'est facile, et ce que nous avons, nous avons œuvré avec passion et abnégation pour l'obtenir. Tu m'as fait devenir Homme. Tu as fait de moi un Père. Nos Enfants sont ce que je possède de plus précieux à tes côtés.

Je ne tire aucune gloire de l'investissement mis dans ce travail. Avoir une Famille c'est aussi endurer le fardeau de l'Autre pour pouvoir le porter un jour à son tour. Anne-Laure tu as fait beaucoup pour Nous. C'est donc à mon tour de prendre la suite pour écrire un Nouveau Chapitre de notre Vie de Famille.

## Sommaire

INTRODUCTION		
I- Les tumeurs osseuses primitives.....	- 1 -	
II- Le sarcome d'Ewing.....	- 2 -	
1.1. Épidémiologie .....	- 2 -	
1.2. Étiologie .....	- 3 -	
1.3. Origine de la tumeur.....	- 4 -	
1.4. Diagnostic .....	- 5 -	
1.5. Le gène de fusion EWS-FLI1.....	- 7 -	
1.6. Les traitements actuels .....	- 9 -	
III- Les canaux ioniques.....	- 11 -	
1. Généralités sur les canaux ioniques : la membrane cytoplasmique et le potentiel membranaire -	11 -	
2. Les canaux potassiques .....	- 12 -	
2.1. Les canaux potassiques à deux segments transmembranaires et un domaine pore dit	canaux à rectification entrante.....	- 14 -
2.2. Les canaux potassiques à quatre segments transmembranaires et deux domaines pores dits	canaux de fond $K_{2p}$ .....	- 18 -
2.3. Les canaux potassiques dépendants du potentiel ou canaux voltage-dépendants .....	- 19 -	
2.4. Les canaux potassiques de la famille Slo .....	- 21 -	
2.5. Les canaux potassiques activés par le calcium.....	- 22 -	
IV- Implication des canaux potassiques activés par le calcium dans les processus de tumorigenèse. -	24 -	
1. Généralités sur l'implication des canaux potassiques dans le processus de progression	tumorale.....	- 24 -
2. Implication des canaux potassiques activés par le calcium dans la tumorigenèse .....	- 25 -	
2.1. Implication du canal Slo1 ou BKCa.....	- 25 -	
2.1. Implication du canal IK.....	- 26 -	
2.2. Implication du canal SK2.....	- 26 -	
2.3. Implication du canal SK3.....	- 27 -	
2.4. Implication du canal SK1 .....	- 27 -	
V- Objectifs du projet.....	- 28 -	
MATERIELS ET METHODES		
I- Culture cellulaire .....	- 43 -	

II- Extraction d'ARN, transcription inverse, et PCR quantitative.....	- 43 -
1. Extraction des ARN totaux .....	- 43 -
2. Transcription inverse.....	- 44 -
3. PCR quantitative .....	- 44 -
III- Western blot.....	- 45 -
1. Extraction protéique .....	- 45 -
2. Préparation des échantillons et migration .....	- 45 -
3. Transfert .....	- 46 -
4. Saturation .....	- 46 -
5. Incubation des anticorps.....	- 46 -
6. Révélation .....	- 47 -
IV- Transfection transitoire : extinction d'EWS-FLI1 par siRNA.....	- 47 -
V- Transfection transitoire : étude de vecteurs « gène rapporteur » .....	- 47 -
1. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 dans les lignées d'ostéosarcomes, de sarcomes d'Ewing et ASP14 .....	- 47 -
2. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 après extinction d'EWS-FLI1 par siRNA dans la lignée A673 .....	- 48 -
3. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 dans la lignée COS-7 co-transfectée avec des doses croissantes de vecteur vide et/ou de surexpression d'EWS-FLI1 .....	- 48 -
3.1. Plasmides utilisés .....	- 48 -
3.2. Méthodologie .....	- 50 -
VI- Etude du promoteur de <i>KCNN1</i> .....	- 50 -
1. Délétions en 5' du promoteur.....	- 50 -
1.1. Sous-clonage des différentes constructions du promoteur <i>KCNN1</i> .....	- 50 -
1.2. Dosage de l'activité luciférase .....	- 51 -
2. Analyse du promoteur de SK1 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) .....	- 53 -
2.1. Obtention de la chromatine .....	- 53 -
2.2. Vérification de l'efficacité de la sonication .....	- 54 -
2.3. Immunoprécipitation de la chromatine.....	- 54 -
2.4. Analyse par PCR semi-quantitative .....	- 54 -
3. Caractérisation de l'élément de réponse à EWS-FLI1 du promoteur de <i>KCNN1</i> par expérience de gel retard EMSA : mise au point des conditions expérimentales .....	- 56 -

3.1. Extraction des protéines nucléaires des lignées ASP14 et A673 .....	- 56 -
3.2. Sous-clonage du gène d'expression d'EWS-FLI1 .....	- 56 -
3.3. Production de la protéine recombinante EWS-FLI1 taguée Flag et HA .....	- 58 -
3.4. Expérience de gel retard ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	- 58 -
VII- Extinction de <i>KCNN1</i> par transduction de cellules avec un shRNA .....	- 59 -
VIII- Test de prolifération .....	- 59 -
IX- Test de clonogénicité .....	- 59 -
X- Expérimentation <i>in vivo</i> et histologie des tumeurs .....	- 60 -
1.1. Expérimentation <i>in vivo</i> .....	- 60 -
1.2. Histologie et immunohistochimie .....	- 60 -
I- <i>KCNN1</i> , gène codant le canal SK1, est exprimé dans les lignées de sarcome d'Ewing et constitue une signature des sarcomes d'Ewing .....	- 60 -
1. Expression des gènes codants les canaux SKCa dans des lignées d'ostéosarcome, de sarcome d'Ewing, et des cellules souches mésenchymateuses .....	- 60 -
2. Expression des gènes codants les canaux calciques associés ORAI dans les lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing .....	- 61 -
3. Expression de <i>KCNN1</i> dans des tumeurs de patients atteints de différents cancers .....	- 62 -
II- EWS-FLI1 régule l'expression de SK1 .....	- 63 -
1. L'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de <i>KCNN1</i> .....	- 63 -
2. Etude de la modulation de l'expression de <i>KCNN1</i> par EWS-FLI1 à l'aide du plasmide pSK1-lux contenant la région -1497 à +174 du promoteur de <i>KCNN1</i> .....	- 66 -
3. EWS-FLI1 se lie au promoteur proximal de <i>KCNN1</i> .....	- 67 -
3.1. Etude de la fixation d'EWS-FLI1 au promoteur de <i>KCNN1</i> par ChIP .....	- 67 -
3.2. Etude de la régulation transcriptionnelle de <i>KCNN1</i> par EWS-FLI1 à l'aide de délétions en 5' du promoteur de <i>KCNN1</i> .....	- 69 -
4. Identification de l'élément de réponse à EWS-FLI1 : Mise au point des expériences d'EMSA -	
72 -	
4.1. Etude de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde d'ADN contenant une séquence consensus d'EWS-FLI1 .....	- 72 -
4.2. Construction du vecteur d'expression FLAG-HA-EWS-FLI1-pcDNA3.1 .....	- 73 -
4.3. Etude de l'interaction de la protéine recombinante EWS-FLI1 avec une sonde d'ADN contenant une séquence consensus d'EWS-FLI1 .....	- 75 -



III- *KCNN1* module la prolifération cellulaire et la croissance tumorale dans les sarcomes d'Ewing -  
76 -

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# Listes des abréviations

---

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ADP : Adenosine-Di-Phosphate

ARN : Acide Ribo Nucléique

ATP : Adenosine-Tri-Phosphate

BSA : Bovine Serum Albumin

ChIP : Chromatine Immuno-Precipitation

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

EWS : Ewing Sarcoma RNA binding protein

FLI1 : Friend Leukemia Integration 1 transcription factor

HA : Human influenza hemagglutinin

MSC : Mesenchymal Stem Cell

pb : paire de bases

PIC: Protease Inhibitor Cocktail

PIP2 : Phosphatidyl Inositol diPhosphate

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

PNET : Primary Neuro-Ectodermal Tumors

RT-qPCR : Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SKCa/SK : Small conductance calcium-activated potassium channel

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

# Liste des figures

---

Figure 1 : Cercle vicieux et sarcomes osseux.....	- 1 -
Figure 2 : Ostéosarcome du tibia.....	- 2 -
Figure 3 : Distribution des atteintes squelettiques des sarcomes d'Ewing.....	- 3 -
Figure 4 : Diagnostic anatomo-pathologique des sarcomes d'Ewing.....	- 6 -
Figure 5 : La protéine de fusion EWS-FLI1.....	- 8 -
Figure 6 : Fonctionnement de la pompe Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase.....	- 12 -
Figure 7 : Arbre phylogénétique des 80 membres de la famille des canaux potassiques.....	- 13 -
Figure 8 : Canaux potassiques Kir. ....	- 14 -
Figure 9 : Mécanisme d'activation des canaux à rectification entrante activée par les protéines G....	- 16 -
Figure 10 : Représentation schématique des canaux KATP. ....	- 17 -
Figure 11 : Canaux potassiques à deux domaines pore.....	- 19 -
Figure 12 : Canaux potassiques voltage dépendants.....	- 20 -
Figure 13 : Les canaux potassiques de la famille Slo.....	- 22 -
Figure 14 : Représentation schématique des canaux SKCa. ....	- 23 -
Figure 15 : L'extinction du canal SK3 diminue l'entrée constitutive de Calcium (A), les processus de migration et d'invasion (B) et diminue <i>in vivo</i> la formation de métastases (C). ....	- 27 -
Figure 16 : Vecteur d'expression utilisé pour évaluer l'effet dose réponse transcriptionnelle du promoteur pSK1-Lux. ....	- 49 -
Figure 17 : Vecteur d'expression utilisé pour évaluer l'effet dose réponse transcriptionnelle du promoteur pSK1-Lux.. ....	- 49 -
Figure 18 : Vecteurs d'expression utilisés pour le sous clonage d'EWS-FLI1.. ....	- 57 -
Figure 19 : Evaluation des niveaux d'expression de <i>KCNN1</i> , <i>KCNN2</i> et <i>KCNN3</i> dans des lignées d'ostéosarcome, de sarcome d'Ewing et des cellules souches mésenchymateuses différenciées ou non en ostéoblastes.....	- 60 -
Figure 20 : Evaluation des niveaux d'expression des canaux calciques associés ORAI1, ORAI2, et ORAI3 dans des lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing.....	- 61 -
Figure 21 : Evaluation de l'expression de <i>KCNN1</i> dans des tumeurs de sarcome d'Ewing.. ....	- 62 -
Figure 22 : Représentation du taux de survie à 5 ans de patients atteints de sarcome d'Ewing selon l'expression relative de <i>KCNN1</i> . ....	- 63 -
Figure 23 : L'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de <i>KCNN1</i> et la production de SK1.-	- 64 -
Figure 24 : L'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de <i>KCNN1</i> dans différentes lignées de sarcome d'Ewing. -	- 65 -
Figure 25 : Etude transcriptionnelle à l'aide de vecteurs gènes rapporteurs. ....	- 66 -

Figure 26 : FLI1 se fixe sur le promoteur proximal de <i>KCNN1</i> .....	- 68 -
Figure 27 : Construction des délétions en 5' du promoteur de <i>KCNN1</i> ..	- 70 -
Figure 28: Rôle de la région située entre -1176 et -1005 en amont du site d'initiation dans la régulation de la transcription de <i>KCNN1</i> par EWS-FLI1.....	- 71 -
Figure 29 : Mise au point du protocole d'EMSA par identification de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde double brin contenant un motif GGAA (séquence consensus) à l'aide d'extrait protéique nucléaire de la lignée A673.....	- 73 -
Figure 30 : Construction du plasmide de surexpression de la protéine tagguée FLAG-HA-EWS-FLI1.....	- 74 -
Figure 31 : Mise au point du protocole d'EMSA par identification de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde double brin contenant un motif GGAA (séquence consensus) à l'aide de protéine recombinante.....	- 75 -
Figure 32 : L'extinction de <i>KCNN1</i> module la prolifération cellulaire in vitro et la croissance tumorale in vivo..	- 76 -
Figure 33 : Proposition de mécanisme de régulation de l'expression de <i>KCNN1</i> par EWS-FLI1, et de l'implication de l'expression de <i>KCNN1</i> dans les phénomènes de prolifération cellulaire et de croissance tumorale dans les sarcomes d'Ewing. ....	- 79 -

# Listes des tableaux

---

Tableau 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing. ....	- 3 -
Tableau 2 : Tableau non exhaustif de l'expression de divers canaux potassiques impliqués dans le cancer. ....	- 24 -
Tableau 3 : Résumé des lignées cellulaires utilisées.....	- 43 -
Tableau 4 :Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la qPCR .....	- 44 -
Tableau 5 : Références et sources et des anticorps primaires et secondaires utilisés.....	- 46 -
Tableau 6 : Table des amorces utilisées pour le sous-clonage des délétions en 5' du promoteur de <i>KCNI</i> .....	- 51 -
Tableau 7 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR semi quantitative du protocole de ChIP-	55

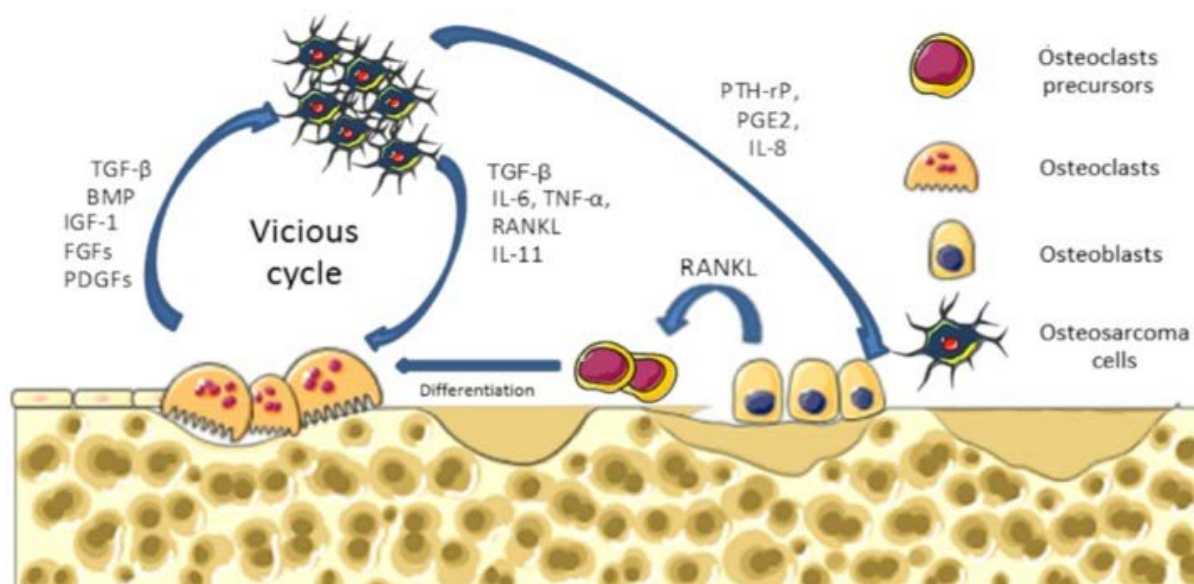
-

# **INTRODUCTION**

## I- Les tumeurs osseuses primitives

Le tissu osseux est un tissu vivant en constante évolution dans le temps. Il est le siège d'un processus physiologique appelé remodelage osseux qui correspond à une succession de phases de dégradation assurées par les ostéoclastes, et de formation réalisées par les ostéoblastes. Le remodelage osseux repose donc sur cet équilibre entre dégradation et formation osseuse.

Lors de certaines pathologies comme les tumeurs osseuses primitives se produit un dérèglement de cet équilibre associé au développement tumoral. On parle alors de cercle vicieux entre la croissance tumorale et la destruction osseuse (Heymann and Rédini, 2011). Schématiquement, les cellules tumorales produisent des facteurs ostéolytiques qui vont favoriser la destruction osseuse qui va conduire à la libération de facteurs pro-tumoraux stockés dans la matrice osseuse qui vont alors favoriser la croissance tumorale (Figure 1).



**Figure 1 : Cercle vicieux et sarcomes osseux. Les cellules tumorales synthétisent des cytokines ou facteurs de croissance capables d'activer la dégradation osseuse. Cette lyse osseuse permet alors la libération de facteurs de croissance qui vont à leur tour stimuler la croissance tumorale (Lamora *et al.*, 2016).**

Les tumeurs osseuses primitives sont des tumeurs rares dont le développement initial est situé au niveau du tissu osseux. On distingue d'un côté les tumeurs osseuses primitives bénignes (Tumeur à cellules géantes, ...) et les tumeurs osseuses primitives malignes regroupant les chondrosarcomes, les ostéosarcomes et les sarcomes d'Ewing. Bien que ces cancers ne représentent qu'1% des cancers, ils constituent les principales tumeurs osseuses primitives chez les enfants et les adolescents (pic d'incidence de 18 ans pour les ostéosarcomes et de 15 ans pour les sarcomes d'Ewing). Elles représentent environ 90% des tumeurs osseuses primitives malignes pédiatriques (Desandes *et al.*, 2016). Grâce au réseau ResOs, on estime l'incidence des ostéosarcomes et des sarcomes d'Ewing à respectivement 150 et 80 nouveaux cas par an en France.

Ces sarcomes osseux se caractérisent par une ostéolyse associée à la croissance tumorale, accompagnée ou non de métaplasie ostéoïde (formation ectopique de tissu osseux au sein de la lésion tumorale) (Figure 2).

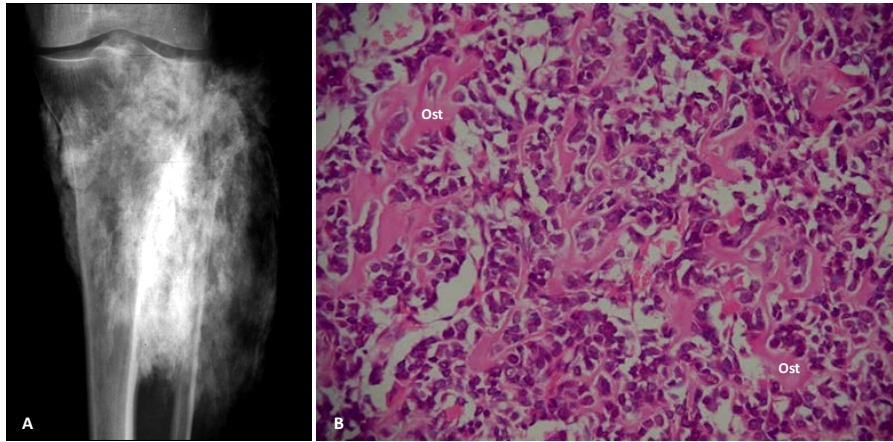


Figure 2 : Ostéosarcome du tibia. A) Aspect radiographique d'un ostéosarcome. On note les plages radio-opaques de formation osseuse ectopique. B) Aspect histologique (coloration Hématoxyline et Eosine). On note les formations ostéoïdes (Ost) au sein de la tumeur.

Les traitements conventionnels consistent en une première cure de chimiothérapie suivie d'une résection de la tumeur suivie dans la plupart des cas d'une seconde cure de chimiothérapie.

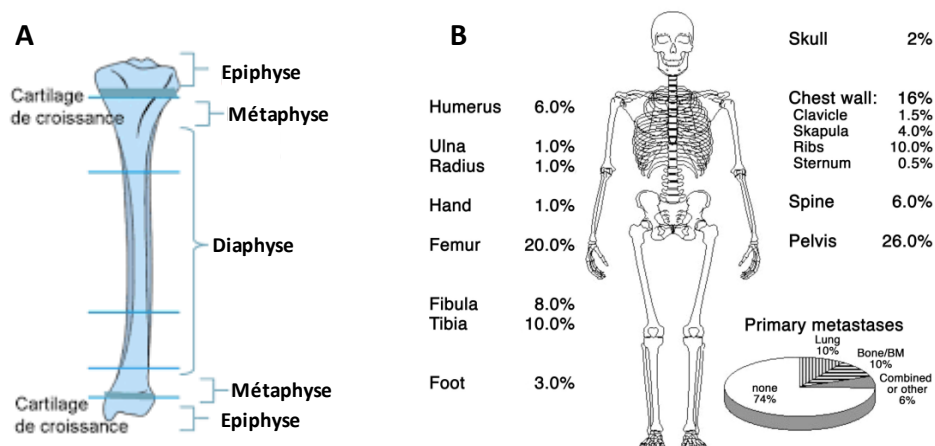
Le taux de survie à 5 ans est de 70%, mais ce taux chute drastiquement à moins de 30% quand des métastases pulmonaires sont détectées au diagnostic.

## II- Le sarcome d'Ewing

### 1.1. Épidémiologie

Le sarcome d'Ewing représente la deuxième tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente après l'ostéosarcome. Cette tumeur touche principalement l'enfant et le jeune adulte, avec un pic d'incidence autour de 15 ans. Avec environ 200 nouveaux cas diagnostiqués chaque année aux États-Unis, son incidence annuelle dans la population est d'environ 2,93 cas / millions d'enfants (Esiashvili *et al.*, 2008). D'autre part, cette tumeur osseuse est plus fréquemment rencontrée chez les garçons avec un rapport de 1,2 à 1,5 et s'avère rare chez les populations afro-américaine et asiatique. Environ 85 % des sarcomes d'Ewing sont osseux avec une prédominance au niveau de la diaphyse des os longs : fémur, tibia, fibula, humérus (Figure 3A). Ils peuvent également être localisés au niveau de la ceinture pelvienne et de la cage thoracique avec une fréquence variable (Bernstein *et al.*, 2006) (Figure 3B). Les sarcomes d'Ewing s'accompagnent de tumeurs des parties molles souvent volumineuses en particulier au niveau des os plats.





**Figure 3 : Distribution des atteintes squelettiques des sarcomes d'Ewing. A) Les atteintes, principalement diaphysaire, touchent principalement les os longs (humérus, fémur, fibula et tibia). B) Les os de la cage thoracique et le pelvis sont également touchés à de moindre fréquence. Le développement des métastases touchent principalement les poumons (Bernstein *et al.*, 2006)**

Par ailleurs, le risque de métastases est très important et facteur de mauvais pronostic. Il est estimé que 15 à 25% des patients présentent une forme métastatique de la pathologie au moment du diagnostic et les sites métastatiques les plus fréquents sont les poumons et dans une moindre mesure des localisations médullaires ou osseuses (Durer and Shaikh, 2020).

### 1.2. Étiologie

Le développement du sarcome d'Ewing est associé à une translocation chromosomique donnant naissance à un gène de fusion spécifique entre le gène *EWS* et un gène de la famille *ETS* (Erythroblast Transformation Specific). La translocation  $t(11;22)(q24;q12)$ , entre les gènes *FLI1* et *EWS*, est la plus fréquemment rencontrée (environ 85% des cas) et génère le gène de fusion *EWS-FLI1* (Delattre *et al.*, 1992) Dans environ 10% des cas, une translocation a lieu entre les gènes *ERG* et *EWS*,  $t(21;12)(22;12)$ , donnant naissance au gène de fusion *EWS-ERG* (Maire *et al.*, 2008). Et dans les 1-5 % restants, plusieurs translocations sont possibles entre le gène *EWS* et un membre de la famille *ETS* tel que *ETV1* ou 4 avec des fréquences variables (Potratz *et al.*, 2012) (Tableau 1). De manière générale les taux de survie des patients en fonction du type de translocation varient peu (Le Deley *et al.*, 2010).

Membre de la famille EWS	Membre de la famille ETS	Fréquence (%)
EWS	FLI1	85
EWS	ERG	10
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

**Tableau 1 : Principales translocations chromosomiques responsables du sarcome d'Ewing (Riggi and Stamenkovic, 2007).**

EWS-FLI1 agit comme un facteur de transcription aberrant capable d'activer ou de réprimer, directement ou indirectement, la transcription de certains gènes à potentiel oncogénique. Ainsi, ce facteur joue un rôle clé dans la tumorigenèse du sarcome d'Ewing.

Par ailleurs, d'autres altérations aspécifiques peuvent être retrouvées. En effet, la présence de ces altérations dans environ 17% des cas constitue un facteur de mauvais pronostic (Grünewald *et al.*, 2018; Honoki *et al.*, 2007).

Ainsi, des mutations de STAG2 dans 15 à 20% des sarcomes d'Ewing et des délétions de CDKN2A dans 10 à 22% des cas sont observées (Grünewald *et al.*, 2018; Tirode *et al.*, 2014).

Par ailleurs, tandis que l'on retrouve des mutations de TP53 dans la plupart des cancers (Kandoth *et al.*, 2013), celle-ci n'est rencontrée que dans 5 à 7% des sarcomes d'Ewing (Grünewald *et al.*, 2018; Honoki *et al.*, 2007; Tirode *et al.*, 2014). Néanmoins, d'autres études semblent indiquer qu'EWS-FLI1 pourrait directement inactiver la voie p53 promouvoir ainsi la tumorigenèse des sarcomes d'Ewing (Rorie and Weissman, 2004). L'effet de toutes ces altérations peut également se cumuler puisque l'inactivation conjointe de p53, p16 et p14 constitue un groupe de tumeurs particulièrement résistantes à la chimiothérapie (Huang *et al.*, 2005).

### 1.3. *Origine de la tumeur*

Décrit en 1921 par James Ewing, le sarcome d'Ewing a été initialement inclus dans la famille des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET). Actuellement, bien que l'origine mésenchymateuse de ces tumeurs soit préférentiellement privilégiée, l'origine de cette tumeur n'est pas encore clairement établie et reste un sujet controversé (Kovar, 2010; Lin *et al.*, 2011). Deux théories principales suggèrent que cette tumeur serait issue soit de cellules primaires provenant de la crête neurale, soit de cellules souches mésenchymateuses (MSC).

#### a) Origine neuroectodermique

Histologiquement, les cellules de sarcome d'Ewing ressemblent aux cellules primitives neuroectodermiques. De plus, des marqueurs neuronaux précoces tels que le marqueur NSE (*neuron-specific enolase*) et S-100 peuvent être retrouvés dans ces tumeurs (Cavazzana *et al.*, 1987). D'autres travaux ont également mis en évidence que des stimulations appropriées sont à même d'induire *in vitro* la différenciation des sarcomes d'Ewing dans la voie neuronale avec l'apparition d'un phénotype neuronal et de marqueurs caractéristiques (Navarro *et al.*, 1990). EWS-FLI1 est également capable d'inhiber la différenciation neuronale de cellules de neuroblastome (Rorie and Weissman, 2004).

Malgré ces différentes données suggérant une origine neuroectodermique, des doutes persistent concernant cette idée. En effet, il a été montré qu'EWS-FLI1 est capable d'induire la différenciation neuroectodermique et d'augmenter l'expression de marqueurs précoces de cette différenciation (Hulskovan *et al.*, 2005; Teitell *et al.*, 1999). Dès lors, ces travaux suggèrent donc que les

caractéristiques neuroectodermiques des sarcomes d'Ewing seraient probablement liées à l'expression d'EWS-FLI1 plutôt qu'à leur origine cellulaire.

### b) Origine mésodermique

La seconde hypothèse réside dans le fait que les sarcomes d'Ewing dériveraient des cellules souches mésenchymateuses. En effet, la localisation osseuse de cette tumeur ainsi que des expériences basées, entre autres, sur l'inhibition d'EWS-FLI1, sont en faveur d'une origine mésenchymateuse des sarcomes d'Ewing.

Des travaux menés par l'équipe de Tirode et collaborateurs (Tirode *et al.*, 2007), ont montré que suite à l'inhibition d'EWS-FLI1 dans différentes lignées de sarcome d'Ewing, ces cellules acquièrent alors la capacité à se différencier dans les voies chondroblastiques, ostéoblastiques et adipogéniques. Dans cette même étude, les auteurs ont également mis en évidence que le profil d'expression génique de ces cellules tend à converger vers celui des MSC. Deux études ont également démontré qu'EWS-FLI1 est capable d'induire la transformation de MSC murines, et que l'implantation de ces cellules dans des souris immunocompétentes entraîne la formation de tumeurs dont les caractéristiques (marqueurs cellulaires, morphologie...) sont similaires à celles des sarcomes d'Ewing (Castillero-Trejo *et al.*, 2005; Riggi *et al.*, 2005). D'autre part, l'expression d'EWS-FLI1 dans la lignée de MSC murine pluripotente C3H10T1/2 inhibe la capacité de ces cellules à minéraliser *in vitro* et réprime l'expression de gènes des différenciations ostéoblastiques et adipocytaires de manière concomitante à une induction de l'expression de gènes neuronaux (González *et al.*, 2007). Cependant, à l'inverse des études réalisées sur un modèle murin, l'expression d'EWS-FLI1 dans des MSC humaines induit l'expression de gènes nécessaires à leur transformation en cellules cancéreuses similaire aux sarcomes d'Ewing, mais n'est pas suffisante pour induire la formation d'une tumeur chez des souris immunodéficientes (Riggi *et al.*, 2008).

De nombreuses données supportent donc une origine mésenchymateuse du sarcome d'Ewing. Cependant, il est clair que la simple inhibition d'EWS-FLI1 dans ces cellules tumorales n'est pas suffisante pour reverser leur phénotype en MSC saines (Lin *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'expression des marqueurs neuronaux étant strictement dépendante d'EWS-FLI1, une hypothèse consiste à dire que les sarcomes d'Ewing sont d'origine mésenchymateuse mais qu'EWS-FLI1 favorise la différenciation de ces cellules vers un phénotype neuronal (Potikyan *et al.*, 2008).

## 1.4. *Diagnostic*

### a) Tableau clinique

Le sarcome d'Ewing est caractérisé par une croissance rapide et une destruction massive et extensive des os touchés qui peut induire des douleurs osseuses ainsi que des fractures pathologiques. Les signes révélateurs de la maladie sont tout d'abord une douleur intermittente, puis persistante au repos, dont l'intensité croît généralement progressivement sur plusieurs semaines. Cette évolution

progressive entraîne fréquemment des retards de diagnostic. Dans 15 à 20 % des cas, la douleur et la présence d'une masse s'accompagnent également de signes généraux, associés au développement de la tumeur, en particulier de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement. Ces signes généraux sont souvent associés à une maladie métastatique ou à une localisation pelvienne. Dans le cas de métastases pulmonaires, des signes respiratoires révélateurs peuvent être observés et dans le cas d'une tumeur vertébrale, des douleurs radiculaires et une compression médullaire (Bernstein *et al.*, 2006).

Cette tumeur présente un caractère très ostéolytique et très agressif, avec un aspect mal limité associé à une destruction de la corticale osseuse (Figure 4 A et B), des appositions périostées et une atteinte des parties molles. Bien que la tumeur ne produise pas d'os, elle est condensante au scanner du fait des dépôts secondaires de calcium sur les travées osseuses. Ainsi, la radiographie, l'IRM (imagerie par résonance magnétique), le scanner thoracique, le scanner osseux et la tomographie par émission de positons peuvent être utilisés pour établir le diagnostic clinique et rechercher d'éventuelles métastases pulmonaires et osseuses.

#### b) Caractéristiques cellulaires

Le diagnostic repose sur l'analyse histopathologique d'une biopsie de la tumeur. Ainsi, au niveau histologique, le sarcome d'Ewing est une tumeur à petites cellules rondes (Figure 4 C) avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et un cytoplasme positif au PAS (Periodic Acid Schiff).

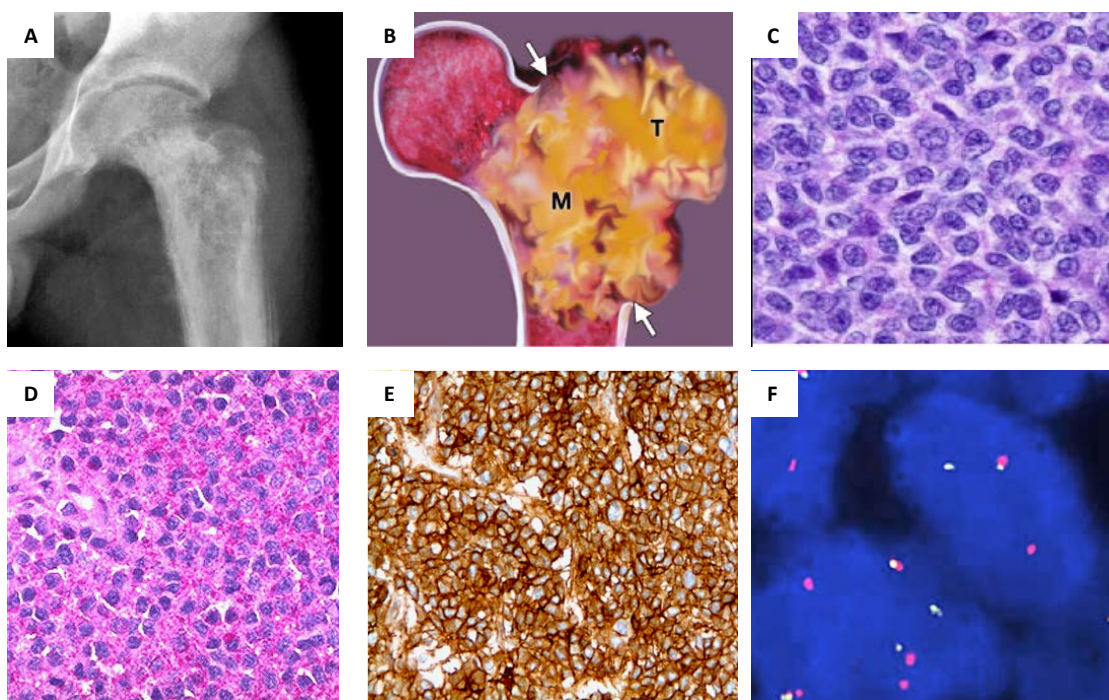


Figure 4 : Diagnostic anatomo-pathologique des sarcomes d'Ewing. A) Aspect radiographique d'un sarcome d'Ewing du fémur proximal laissant apparaître des plages d'ostéolyse. B) Aspect macroscopique d'un sarcome d'Ewing du fémur proximal. On note l'envahissement intramédullaire de la tumeur (M) et son extension dans les tissus mous (T) par destruction corticale focale (flèches) (Murphey *et al.*, 2013). C, D, E, et F) Après coloration histologique, les sarcomes d'Ewing se présentent comme des tumeurs à petite cellule rondes (C), avec un cytoplasme positif au PAS (D) (grossissement x40). Ces cellules expriment majoritairement le CD99 (E), et l'hybridation à l'aide d'une sonde de fission fluorescente (FISH) montre des réarrangements du locus *EWS* (F).

Une analyse immunohistochimique montre que dans 90 % des cas, les cellules de sarcome d'Ewing expriment de façon membranaire le marqueur CD99 (Figure 4E), généralement associé aux cellules lymphoïdes et qui jouerait un rôle dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium. Selon leur degré de différenciation neuroectodermique, les cellules de sarcome d'Ewing peuvent aussi exprimer des marqueurs neuronaux tels que le NSE, S-100, la synaptophysine et le CD57 (Riggi and Stamenkovic, 2007).

Conjointement aux analyses histopathologiques, la recherche de réarrangements du locus *EWS* par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) de fission peut être utilisée pour confirmer le diagnostic (figure 4F), même si aujourd'hui la recherche du transcrite de fusion par biologie moléculaire (RT-qPCR, RNAseq) est devenue un examen de routine.

### 1.5. *Le gène de fusion EWS-FLI1*

#### a) *Le gène EWS*

Le gène *EWS* (*Ewing Sarcoma*), localisé sur le chromosome 22, est exprimé de manière ubiquitaire mais sa fonction n'est pas encore très bien connue. *EWS* fait partie des gènes de la famille TET codant une protéine ayant un domaine impliqué dans la fixation ARN/protéine (Ohno *et al.*, 1994). En effet, les protéines TET possèdent un nombre variable de répétitions arginine-glycine-glycine permettant leur fixation à l'ARN et un domaine N-terminal riche en glutamine qui fera partie de la protéine EWS-ETS après translocation. Ainsi, *EWS* peut se fixer à l'ARN *in vitro* et s'associer à des facteurs de transcription ou des régulateurs de la transcription, tels que le TFIID, l'ARN polymérase II et le CBP/p300 (Bertolotti *et al.*, 1996). Il peut également interagir avec des protéines impliquées dans l'épissage.

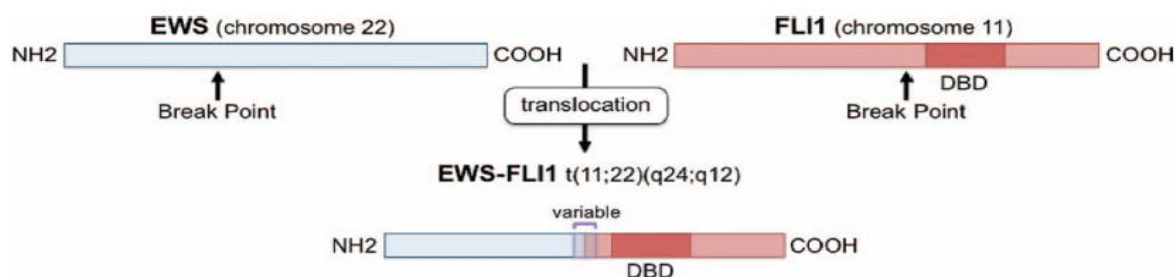
#### b) *Le gène FLI1*

Le gène *FLI1* (*Friend Leukemia Integration 1*), localisé sur le chromosome 11, est un facteur de transcription identifié en 1990 (Ben-David *et al.*, 1990), retrouvé principalement chez l'adulte dans les cellules hématopoïétiques, et de façon moins importante dans le cœur, les poumons et les ovaires. Il semble jouer un rôle dans l'hématopoïèse et l'angiogenèse (Spyropoulos *et al.*, 2000). *FLI1* est composé de deux domaines ETS en 5' et 3', séparés par un domaine FLS (*FLI-1 specific*) (Rao *et al.*, 1993). Les domaines 5'-ETS et FLS forment le domaine ATA (*Amino-terminal Transcriptional Activation*) alors que le domaine 3'-ETS contient le domaine de fixation à l'ADN et le domaine CTA (*Carboxy-terminal Trans-Activation*).

#### c) *Le gène de fusion EWS-FLI1*

La translocation t(11;22) génère le gène de fusion *EWS-FLI1* codant une protéine oncogénique formée par l'association du domaine N-terminal de *EWS* et du domaine C-terminal de *FLI1* (domaine de fixation à l'ADN) (Figure 5). La substitution du domaine N-terminal natif de *FLI1* (domaine

activateur de la transcription) par le domaine N-terminal d'EWS confère aux domaines activateurs de cette protéine de fusion une capacité accrue à activer les gènes cibles en comparaison des domaines présents sur les facteurs de la famille ETS natifs (May Wa *et al.*, 1993). L'analyse des séquences d'EWS-FLI1 montre qu'il existe au moins trois formes différentes du transcrit EWS-FLI1 selon les points de cassure de EWS et de FLI1 et donc le nombre d'exons appariés.



**Figure 5 : La protéine de fusion EWS-FLI1. La variabilité au niveau du point de cassure de FLI1 génère 3 types de fusions distinctes. (DBD : DNA-binding domain, ou domaine de liaison à l'ADN) (Potratz *et al.*, 2012)**

Cette translocation aboutit à l'expression par les cellules tumorales d'une protéine de fusion EWS-FLI1 qui se comporte alors comme un facteur de transcription aberrant. Il migre dans le noyau et se fixe à l'ADN sur des sites spécifiques afin d'induire ou de réprimer la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'oncogenèse. Ce facteur de transcription cible des promoteurs contenant des sites de fixation pour ETS et AP-1 en tandem et il se fixe alors à ces éléments en interagissant avec FOS et JUN (Kim S *et al.*, 2006). De plus, des études ont démontré qu'EWS-FLI1 se fixe également sur des séquences microsatellites contenant des répétitions GGAA afin de réguler le mécanisme de transcription (Gangwal *et al.*, 2008; Guillon *et al.*, 2009). Par ailleurs, lors de sa fixation au promoteur, EWS-FLI1 peut également s'associer à d'autres protéines (notamment la RNA helicase A) qui jouent alors le rôle de co-activateur de la transcription (Toretzky Ja *et al.*, 2006).

#### d) Les cibles d'EWS-FLI1

EWS-FLI1 exerce son action oncogénique en modulant l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Des études transcriptomiques, après surexpression ou inhibition d'EWS-FLI1, ainsi que des études par immuno-précipitation de la chromatine ont permis de mettre en évidence un très grand nombre de gènes cibles d'EWS-FLI1. Toutefois, le type de régulation (directe ou indirecte) n'a pas toujours été défini (Mackintosh *et al.*, 2010).

Ainsi, EWS-FLI1 contribue à la tumorigenèse des sarcomes d'Ewing soit en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la transformation et la progression tumorale (MYC, IGF1...), soit en réprimant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et l'inhibition de la prolifération (TBRII, p21...).

EWS-FLI1 va notamment induire la transcription du gène NKx2.2, capable à son tour de réprimer ou d'activer la transcription de nombreux gènes, cibles indirectes d'EWS-FLI1. Cette activation de NKx2.2 est indispensable à la transformation oncogénique des cellules de sarcome d'Ewing (Potratz *et al.*, 2012). De plus, la protéine EWS-FLI1 exerce également une action oncogénique en réprimant l'expression de l'IGFBP-3 (*IGF-Binding-Protein-3*), qui est capable d'inhiber le facteur de croissance IGF-1. Ainsi, l'IGF-1 n'étant plus inhibé, cela va favoriser une prolifération anarchique des cellules (Zobel *et al.*, 2003) (Prieur *et al.*, 2004). Par ailleurs, les mécanismes épigénétiques, tels que des modifications de la chromatine par acétylation et méthylation des histones, régulant l'expression génique, sont impliqués dans le développement tumoral. Ainsi, une autre cible directe clé dont l'expression est augmentée par EWS-FLI1 est EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*), qui est capable d'inhiber l'expression de certains gènes par son activité histone méthyl-transférase (Burdach *et al.*, 2009; Potratz *et al.*, 2012).

EWS-FLI1 inhibe également la différenciation ostéoblastique, par sa fixation à *RUNX2* (Li X *et al.*, 2010), ainsi que la différenciation chondrocytaire, adipocytaire et myocytaire. L'expression d'EWS-FLI1 participe aussi au phénotype neuronal peu différencié des cellules de sarcome d'Ewing en surexprimant des gènes critiques du développement de la crête neurale (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005).

### 1.6. *Les traitements actuels*

L'enjeu thérapeutique du sarcome d'Ewing est d'assurer à la fois un contrôle systémique et local de la maladie. Les patients doivent donc être pris en charge par des équipes multidisciplinaires comprenant radiologues, anatomopathologistes, chirurgiens et radiothérapeutes, et les biologistes depuis la biopsie et jusqu'à la fin du traitement. Le principal critère pris en compte pour le choix du traitement est la présence ou non de métastases au moment du diagnostic.

#### a) Traitement des sarcomes d'Ewing localisés

Le traitement des tumeurs localisées repose sur trois étapes. La première est l'étape de cytoréduction grâce à une chimiothérapie néo-adjuvante visant à éradiquer les micrométastases et réduire la tumeur locale. Cette chimiothérapie consiste en un protocole de 14 cycles de chimiothérapies. La seconde étape repose sur la résection chirurgicale de la tumeur locale, réalisée si possible avec chirurgie conservatrice et reconstruction. La radiothérapie est fréquemment utilisée dans les formes inopérables ou associée à la chirurgie du fait de la radiosensibilité des sarcomes d'Ewing. La dernière étape consiste en une chimiothérapie adjuvante avec ou sans radiothérapie dans le but de minimiser l'apparition de récurrences. Les protocoles de chimiothérapie utilisent des approches combinatoires associant généralement cinq agents : Vincristine, Cyclophosphamide, Ifosfamide, Doxorubicine et Etoposide (Marec-Bérard P *et al.*, 2010).

b) Traitement des sarcomes d'Ewing métastatiques ou récidivants

Cependant, 15 à 25% des patients présentent déjà des métastases au moment du diagnostic. Pour ces formes métastatiques, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de première intention; la chirurgie peut également être appliquée. Lorsqu'elle est possible, la résection des métastases pulmonaires améliore la survie des patients. Cependant, la prise en charge thérapeutique des patients présentant des formes métastatiques ou récidivantes consiste majoritairement à limiter l'évolution de la tumeur le plus longtemps possible.

Grâce à ces différents traitements, la survie à cinq ans de ce type de tumeur est de 70 à 75% pour les formes localisées, alors qu'elle ne dépasse pas 15 à 30% dans les formes métastatiques au diagnostic, ou résistantes aux traitements (Esiashvili *et al.*, 2008; Rodríguez-Galindo *et al.*, 2008).

c) Protocole Euro-EWING 99

Depuis 1999, le traitement de référence du sarcome d'Ewing en Europe suit le protocole clinique Euro-EWING 99 (EUROpean Ewing tumor Working Initiative of National Groups) qui évalue le bénéfice clinique d'une chimiothérapie associant vincristine, ifosfamide, doxorubicine et étoposide (VIDE). Le protocole thérapeutique est constitué de six cures de cette chimiothérapie néo-adjuvante VIDE associées à une résection chirurgicale quand celle-ci est possible. Une randomisation est ensuite réalisée et les patients sont divisés en trois groupes en fonction du volume tumoral, de la réponse histologique et de la présence de métastases au moment du diagnostic. Ainsi, pour la chimiothérapie adjuvante, différentes combinaisons de drogues sont évaluées en fonction du stade de la pathologie (pathologie localisée; métastases pulmonaires; métastases multifocales). Les premiers résultats intermédiaires publiés, concernant les 281 patients atteints de sarcome d'Ewing primaires disséminés inclus entre 1999 et 2005, montrent une survie sans rechute de 27% et une survie globale de 34% (Ladenstein R *et al.*, 2010).

Depuis ces premières données intermédiaires, des résultats encourageants ont été publiés montrant l'efficacité, dans le cas de forme localisée à haut risque de rechute (essai R2Loc incluant 216 patients entre 2000 et 2013), de cures de Busulfan-Melphalan (BuMel) à haute dose suivi d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans cette étude, les patients voient leur survie sans risque de rechute à 3 ans significativement augmentée (67% contre 53% pour le groupe traité par chimiothérapie conventionnelle VAI(vincristine, actinomycine D, ifosfamide), et une survie globale également statistiquement augmentée (78% contre 70% pour le groupe VAI) (Whelan *et al.*, 2018).

Enfin, mené entre 2000 et 2015, l'essai R2Pulm consistait à évaluer sur des patients atteints de sarcomes d'Ewing métastatiques avec atteinte uniquement pulmonaire et/ou pleurale en comparant un traitement par haute dose de BuMel versus une chimiothérapie conventionnelle VAI associée à une radiothérapie pulmonaire. Dans cette étude il n'a cependant pas été possible de montrer un réel bénéfice à l'utilisation d'une thérapie par BuMel pour l'amélioration du taux de survie de ces patients (Dirksen *et al.*, 2019).



#### d) Limites des traitements actuels

Malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique grâce à la polychimiothérapie néoadjuvante et à la chirurgie conservatrice, les taux de survie à cinq ans pour les patients atteints de sarcome d'Ewing restent faibles, notamment en cas de métastases, de formes récidivantes ou dans le cas de l'apparition d'une résistance à la chimiothérapie. Par ailleurs, les séquences de traitements, les hospitalisations répétées et les effets secondaires font de la chimiothérapie un traitement très lourd aboutissant à une perte réelle de qualité de vie pour les patients. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques apparaît donc nécessaire afin d'améliorer l'espérance et la qualité de vie des patients atteints de sarcome d'Ewing. Pour cela, différentes approches moléculaires sont menées afin de mieux comprendre le développement et la progression de ces tumeurs dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses cibles thérapeutiques potentielles ont déjà pu être mises en évidence avec pour objectif d'induire l'apoptose, de diminuer la prolifération, d'induire la différenciation ou encore de prévenir la dissémination des cellules tumorales.

### III- Les canaux ioniques

#### 1. Généralités sur les canaux ioniques : la membrane cytoplasmique et le potentiel membranaire

Les canaux ioniques sont des structures transmembranaires qui assurent le passage des ions au travers des membranes cellulaires. D'un point de vue génétique ces canaux sont codés par plus de 400 gènes et représentent à eux seuls près de 1,5% du génome humain (Huang and Jan, 2014). Historiquement caractérisées sur les tissus dits "électriquement excitables" que sont les tissus nerveux, musculaires striés ou lisses (Gordon, 1990), ces structures moléculaires ont été plus récemment étudiées pour leurs capacités à réguler de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la migration, l'adhésion et la mort cellulaires dans les tissus dits "électriquement non-excitables" (Leanza *et al.*, 2016).

Au repos, il existe une différence de potentiel ionique entre le milieu extracellulaire et intracellulaire qui repose sur un couplage entre deux acteurs aux effets antagonistes. Le premier est la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Figure 6) qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) pour importer simultanément dans la cellule deux ions  $\text{K}^+$  et exporter trois ions  $\text{Na}^+$ . Ce co-transport en faveur d'une sortie de  $\text{Na}^+$  crée un déséquilibre de charges et un gradient de concentration entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Ainsi, le milieu intracellulaire est électronégatif avec une forte concentration en ions  $\text{K}^+$  (150 mM), au contraire du milieu extracellulaire qui est dès lors électropositif avec une faible concentration en  $\text{K}^+$  (5 mM). Le second acteur, un canal potassique, est là pour contrebalancer l'entrée excédentaire d'ions  $\text{K}^+$  dans la cellule et maintenir une différence de potentiel au repos stable entre le milieu intra et extracellulaire.

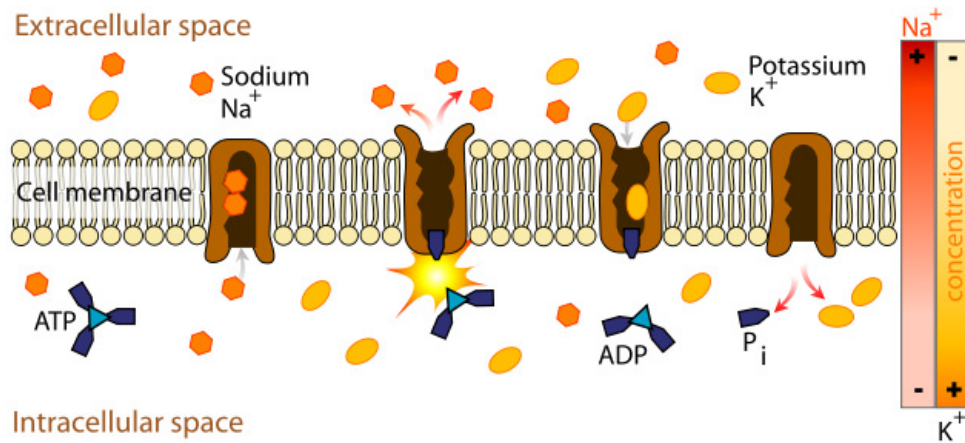


Figure 6 : Fonctionnement de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. La pompe sodium-potassium ou Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase est une protéine transmembranaire hétérotétramérique dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (Pi) pour transporter des ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> contre leur gradient de concentration.

Il s'agit d'une classe spécifique de canaux potassiques appelés canaux potassiques à deux domaines pore ou K2P, ouverts au potentiel de repos et permettant la sortie d'ions K<sup>+</sup> vers le milieu extracellulaire. Cette sortie d'ions K<sup>+</sup> est maintenue jusqu'à un état d'équilibre dans lequel le gradient chimique favorable à cette sortie est compensé par le gradient électrique favorable à l'entrée des ions K<sup>+</sup>. Cet état d'équilibre est appelé potentiel de repos. Considérant que le potentiel de repos repose principalement sur le gradient électrochimique de l'ion K<sup>+</sup>, sa valeur est proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K<sup>+</sup> déterminé par l'équation de Nernst (-85 mV). Dans les cellules eucaryotes, le potentiel de repos varie de -90 à -60 mV selon les types cellulaires. Cette différence de potentiel est indispensable au bon fonctionnement cellulaire.

Dans les cellules excitables telles que les neurones ou les cellules cardiaques, une dépolarisation provoquée par l'ouverture de canaux sodiques et calciques dépendants du potentiel initie un potentiel d'action. Dans les cellules neuronales, l'entrée massive d'ions Na<sup>+</sup> dépolarise fortement la membrane jusqu'à des valeurs proches de +40 mV. La cellule est ensuite repolarisée grâce à la fermeture des canaux sodiques et à l'ouverture concomitante des canaux potassiques activés par le potentiel ou le calcium intracellulaire. La repolarisation membranaire est alors suivie d'une hyperpolarisation due à l'ouverture des canaux potassiques. Le retour au potentiel de repos est également permis par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase. De par leur implication dans le contrôle du potentiel de membrane, les canaux potassiques jouent donc un rôle important dans de nombreux processus cellulaires aussi divers que la libération des neurotransmetteurs, la sécrétion d'insuline ou encore le contrôle de l'homéostasie.

## 2. Les canaux potassiques

Comportant à ce jour 80 membres, il s'agit d'une des plus grandes familles de protéines (Figure 7). Cette remarquable diversité est encore augmentée par l'épissage alternatif et leur capacité à réaliser des hétéromères. Cette variabilité moléculaire reflète leur diversité fonctionnelle leur permettant d'être impliqués dans un grand nombre de fonction physiologiques et dans plusieurs pathologies.

Depuis le clonage du premier canal potassique en 1987 (Papazian *et al.*, 1987), plus de 80 gènes dénommés *KCNxx* codants les sous-unités potassiques ont été clonés chez les mammifères. Les canaux potassiques représentent ainsi la plus grande famille de canaux ioniques. Leur expression est ubiquitaire et ils possèdent des rôles physiologiques très variés.

Pour assurer leur fonction, les canaux potassiques doivent s'associer en homomère ou en hétéromère de 2 ou 4 sous-unités dites  $\alpha$  formant ainsi le pore du canal. Les sous-unités  $\alpha$  des canaux potassiques composées de segments transmembranaires au nombre variable, possèdent des séquences particulières appelées domaine pore ou "boucle P". Celui-ci est extrêmement conservé entre les différentes espèces et est indispensable à la formation du filtre de sélectivité des canaux potassiques. Ainsi l'association de 4 boucles P est nécessaires pour constituer un filtre fonctionnel (MacKinnon, 1991).

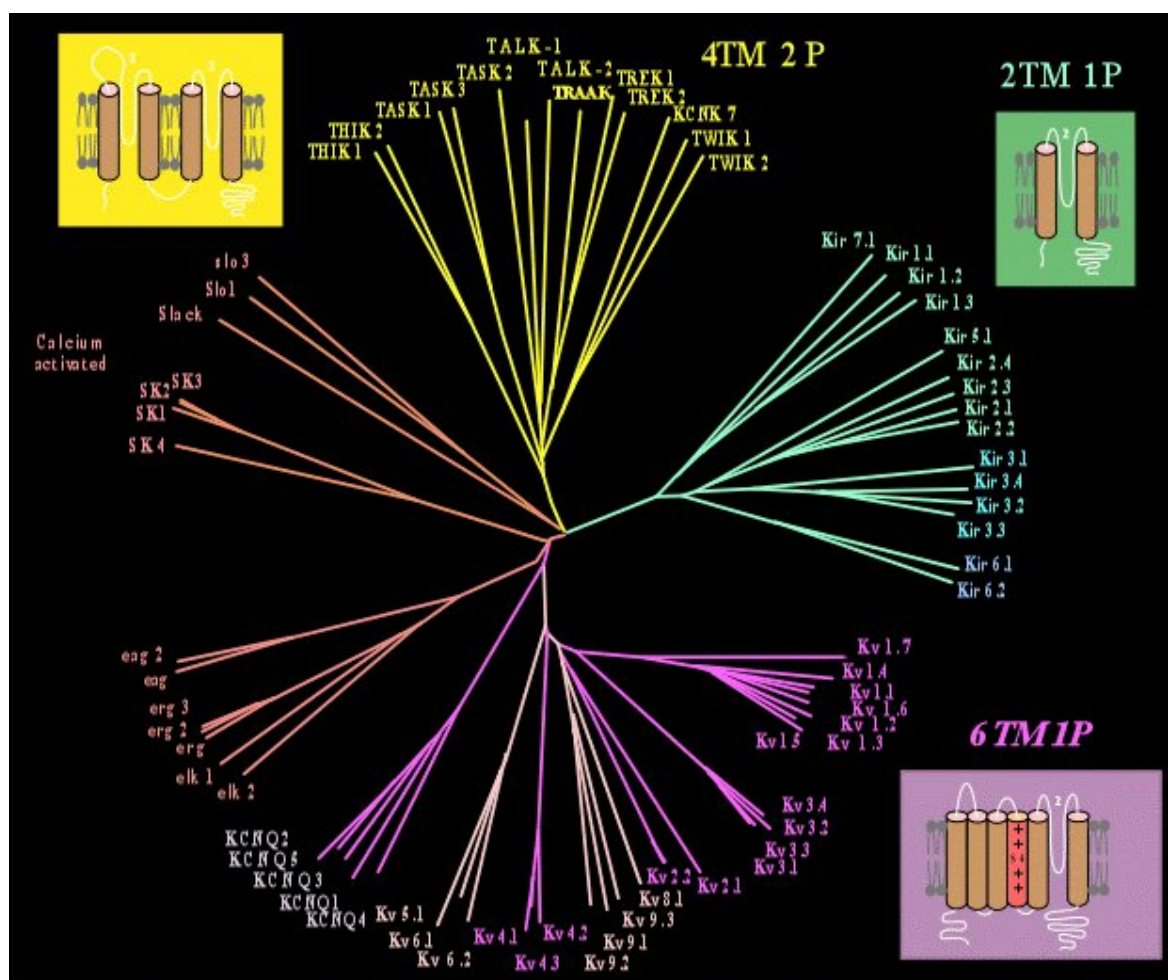


Figure 7 : Arbre phylogénétique des 80 membres de la famille des canaux potassiques. (source : <https://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/ipmc/nomenclature.htm>). Les canaux potassiques sont subdivisés en 4 grands groupes selon principalement le nombre de segments transmembranaires et de domaines pores dont ils sont constitués

Les canaux potassiques participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables du maintien du potentiel transmembranaire, de la transmission de l'influx nerveux et de la rythmogenèse.

Le contrôle et la modulation de l'activité de ces canaux ioniques sont réalisés par variation du potentiel transmembranaire, par action de messagers intracellulaires tels l'IP3, le DAG ou les protéines G, ainsi que par diverses substances telles que le calcium ou le magnésium. Cette activité peut être couplée à des récepteurs membranaires soit directement, soit via des messagers intracellulaires. Les canaux K<sup>+</sup> présentent une grande diversité fonctionnelle et structurale.

## 2.1. Les canaux potassiques à deux segments transmembranaires et un domaine pore dit canaux à rectification entrante

### a) Généralités

L'une des premières descriptions électrophysiologiques de l'existence dans un tissu, les muscles de calamar, de courants à rectification dans les sens entrant a été réalisé par Bernard Katz (Fatt and Katz, 1953). A notre connaissance, cette étude constitue la première observation de l'existence de canaux potassiques à rectification entrante ou Kir (pour *Potassium inward rectifier*). Ceux-ci sont encodés par 15 gènes différents chez les mammifères et subdivisés en 7 sous-classes Kir1.x à Kir7.x selon la nomenclature internationale (Figure 8A).

Ces canaux sont composés de deux segments transmembranaires situés de part et d'autre du domaine pore et sont organisés en homo- ou hétéro-tétramère (Figure 8B).

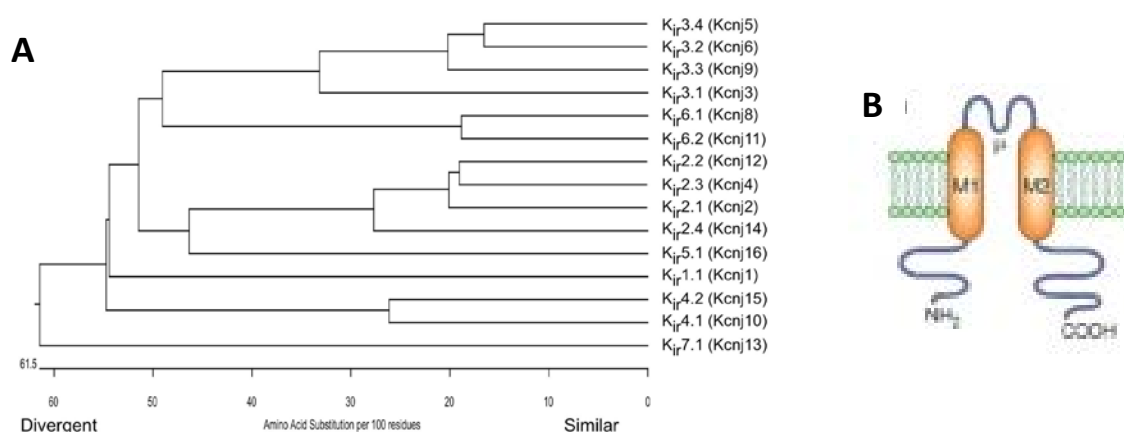


Figure 8 : Canaux potassiques Kir. A) Arbre phylogénétique des 15 membres des canaux Kir2P. B) Structure schématique des sous-unités Kir formées de 2 segments transmembranaires (M1 et M2) et d'un domaine pore (P) (Adelman *et al.*, 2019; Choe, 2002)

Ces canaux favorisent le passage des ions dans le sens entrant au détriment du sens sortant. Cette caractéristique est due au blocage du pore par un ion magnésium ou par des polyamines (Lopatin *et al.*, 1995; Lu and MacKinnon, 1994). L'ion Mg<sup>2+</sup> vient « obstruer » le pore du canal limitant la sortie du

potassium mais n'empêchant pas son entrée. Ces canaux n'ont pas de seuil d'activation mais leur activité dépend du gradient électrochimique et de la concentration en potassium extracellulaire.

Tous les canaux  $K_{ir}$  ne présentent pas la même rectification, en effet, on peut trouver des canaux  $K_{ir}$  dits faibles et d'autres dits forts. Les canaux  $K_{ir}$  sont aussi modulés par des nucléotides comme l'adenosine-tri-phosphate (ATP) et l'adenosine-di-phosphate (ADP), la phosphorylation, les protéines G et le Phosphatidyl inositol diphosphate (PIP<sub>2</sub>).

A ce jour, les 7 sous-familles de  $K_{ir}$  peuvent être regroupées en 4 groupes fonctionnels.

- Les canaux dits classiques ou  $K_{ir2.x}$
- Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G (GIRK) ou  $K_{ir3.x}$
- Les canaux sensibles à l'ATP ou  $K_{ir6.x}$
- Les canaux potassiques ou  $K_{ir1.1}$ ,  $K_{ir4.x}$  (1 et 2),  $K_{ir5.1}$  et  $K_{ir7.1}$

### b) Les $K_{ir}$ dits classiques ou $K_{ir2.X}$

Ces canaux montrent une grande rectification entrante, sont constitutivement activés et on les trouve surtout dans le tissu ventriculaire (Zobel *et al.*, 2003).

Le canal  $K_{ir2.2}$  est retrouvé dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et permet de maintenir le potentiel de membrane obligeant le  $Ca^{2+}$  à entrer dans la cellule au travers de canaux calciques non dépendant du potentiel (Fang *et al.*, 2005).

De manière générale tous les membres de ce groupe fonctionnel se trouvent exprimés dans le cerveau plus particulièrement aux niveaux des somas et dendrites des neurones. Ils y jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de repos et dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire (Day *et al.*, 2005).

Ces canaux ont été décrits comme étant impliqué dans certaines pathologies comme la cardiomyopathie dilatée entraînant un élargissement des ventricules et une insuffisance cardiaque.

Dans cette pathologie, les canaux  $K_{ir2.1}$  et  $K_{ir2.3}$  se retrouvent surexprimés dans l'espace ventriculaire alors que dans le même temps le canal  $K_{ir2.2}$  se retrouve réprimé (Szuts *et al.*, 2013)

### c) Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G (GIRK) ou $K_{ir3.x}$

Ces canaux également dénommés GIRK (pour *protein G Inward Rectifier Potassium channel*) sont, comme leur nom l'indique, modulés par les protéines G. Ce groupe fonctionnel comporte 4 membres que sont  $K_{ir3.1}$ ,  $K_{ir3.2}$ ,  $K_{ir3.3}$ , et  $K_{ir3.4}$ .

Seuls  $K_{ir3.2}$  et  $K_{ir3.4}$  sont capable de former des homotétramères.  $K_{ir3.1}$  et  $K_{ir3.3}$  quant à eux doivent s'associer à une autre sous-unité et former les hétérotétramères fonctionnels (González *et al.*, 2012).

Les GIRK sont activés par les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines  $G_i$  ou  $G_o$  qui viennent se fixer sur la partie N et C-terminale du canal (He *et al.*, 1999) (Figure 9) suite à l'activation du récepteur couplé aux protéines G (RCPG).

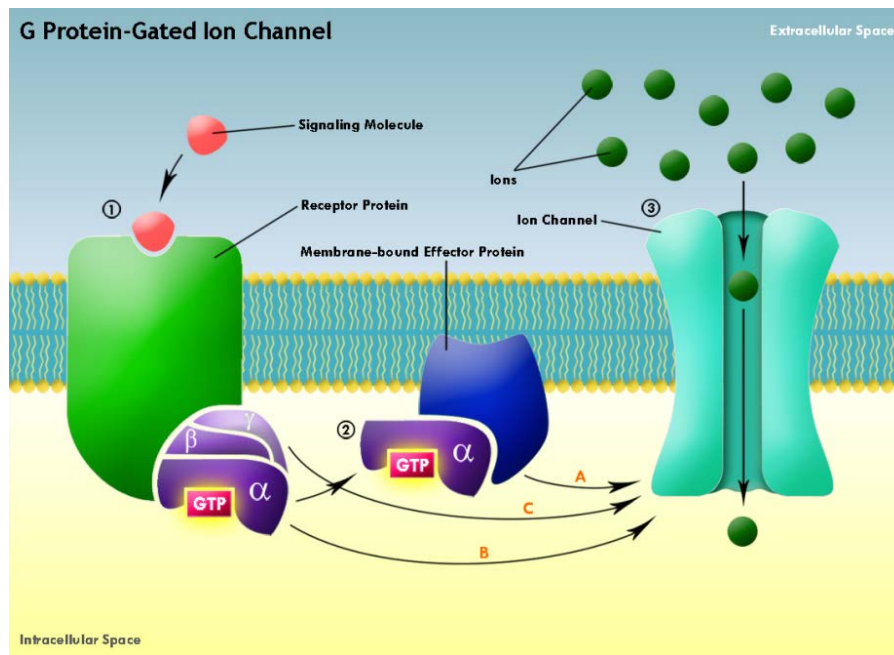


Figure 9 : Mécanisme d'activation des canaux à rectification entrante activée par les protéines G. 1) La fixation du ligand sur le récepteur couplé aux protéines G entraîne une dissociation des sous unités  $\gamma\beta$  du complexe  $\alpha\text{GTP}$ . 2) Le complexe  $\text{G}\beta\gamma$  peut interagir avec les séquences C- et N- terminale des sous-unités du canal et entraîner l'ouverture du canal et l'entrée des ions (3).

Le  $\text{PIP}_2$  joue un rôle important dans la régulation de ces canaux. En effet, l'action des  $\text{G}\beta\gamma$  nécessite du  $\text{PIP}_2$  afin d'activer les canaux GIRK (Huang *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 2002). De plus d'autres travaux tendent à montrer que ces canaux GIRK peuvent aussi être régulés par le sodium intracellulaire (Whorton and MacKinnon, 2011) et la phosphorylation *via* la cAMP-protéine kinase A (Müllner *et al.*, 2009).

Ces canaux sont notamment exprimés dans le cœur, le cerveau et le pancréas. Kir3.1 et Kir3.4 forment dans le cœur le canal KACH. Celui-ci est sensible à l'acétylcholine (ACh) provenant du nerf vague et permet de diminuer le rythme cardiaque. Dans le pancréas, il a été montré que les canaux GIRK sont exprimés et fonctionnels dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, et l'activation de ceux-ci engendre un arrêt de la sécrétion de l'insuline par ces cellules (Iwanir and Reuveny, 2008). Enfin, dans le cerveau, on retrouve surtout les GIRK dans les épines dendritiques au niveau post et pré-synaptique où ils permettent la génération de potentiels post-synaptiques inhibiteurs induits par l'activation des récepteurs GABAB des neurones de l'hippocampe (Lüscher *et al.*, 1997).

#### d) Les canaux sensibles à l'ATP ou Kir6.X

Ces canaux, aussi appelés  $\text{K}_{\text{ATP}}$  ont été décrits pour la première fois dans le tissu cardiaque où ils se retrouvent fortement exprimés dans les membranes sarcolemniques. Ils montrent une faible rectification entrante et sont ouverts de manière constitutive dans le pancréas.

C'est l'état énergétique de la cellule, soit le rapport entre la concentration d'ATP et d'ADP, qui va réguler les  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Lorsque la concentration intracellulaire en ATP augmente, cela va bloquer le canal.

Ces canaux sont composés de 4 sous-unités Kir6.x et de 4 sous-unités de récepteurs sulfonylurés dépendant des tissus (SUR1 dans le pancréas, SUR2A dans le coeur et SUR2B dans les vaisseaux), formant ainsi un hétéro-octomère (Clement *et al.*, 1997). Les sous-unités Kir forment le pore du canal et sont inhibées par l'ATP (Figure 10). Les sous-unités SUR possèdent des sites de fixation à l'ADP et peuvent activer les K<sub>ATP</sub>.

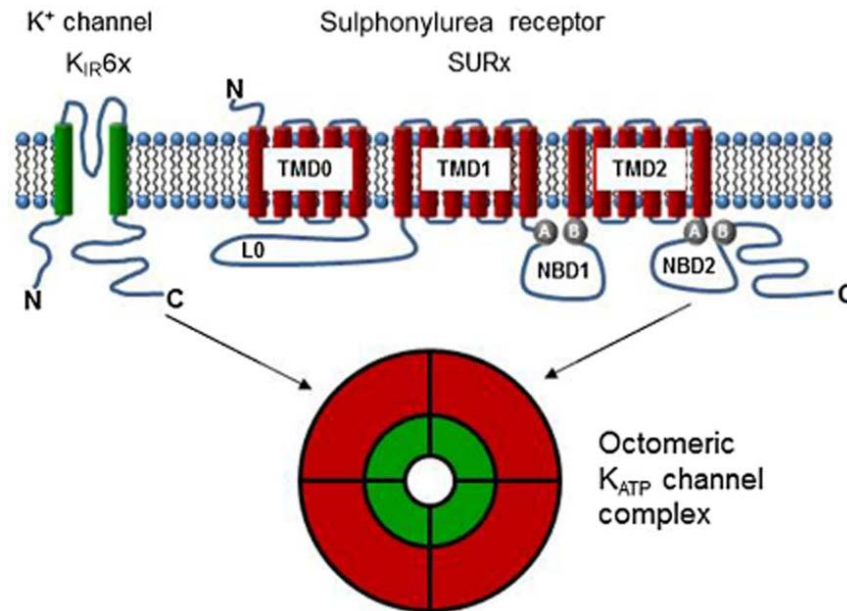


Figure 10 : Représentation schématique des canaux K<sub>ATP</sub>. La sous-unité Kir 6.x et la sous-unité SUR peuvent varier d'un tissu à l'autre. La protéine SUR est organisée en 13 segments transmembranaires et possède 2 sites de fixation pour les nucléotides (NBD1 et NBD2). L'extrémité N-terminale de la sous-unité SUR est extracellulaire, alors que son extrémité carboxylique est intracellulaire. L'assemblage tétramérique des sous-unités Kir 6.x auxquelles sont associées les sous-unités SUR, peuvent définir un canal dont le pore central serait bordé par les domaines pores de Kir 6.x. (Tinker *et al.*, 2014)

Ces canaux jouent un rôle crucial dans les cellules  $\beta$  du pancréas où ils fixent le potentiel de membrane et modulent ainsi la sécrétion de l'insuline en fonction de la balance ATP/ADP (Ashcroft and Rorsman, 1989). Lorsque les taux de glucose circulant sont faibles la concentration en ADP est plus importante que celle en ATP. Ainsi les sous-unités K<sub>ATP</sub> ne sont pas inhibées par l'ATP elles sont au contraire activées par les sous-unités SUR grâce à l'ADP.

Lorsque le taux en glucose circulant augmente la balance ATP/ADP change, la concentration en ATP augmente alors que celle en ADP diminue. Les canaux perdront l'activation induite par les sous-unités SUR et seront en plus inhibés par l'ATP augmentant dans le milieu intracellulaire. Cela entraîne une dépolarisation de ces cellules et l'entrée de Ca<sup>2+</sup> via les canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant de type L. Cela a pour conséquence la fusion des vésicules avec la membrane plasmique et ainsi la libération de l'insuline.

Enfin, on retrouve ces canaux dans le coeur où ils ont un rôle de protection contre les ischémies (Nichols and Lederer, 1991).

e) Les canaux potassiques ou autres Kir ou Kir1.1, Kir4.X (1 et 2), Kir5.1 et Kir7.1

**Kir1.1** : Anciennement appelé ROMK1 (pour *Renal Outer Medullary K<sup>+</sup> channel*), ce canal est surtout exprimé dans le rein (membrane apicale des cellules de l'anse de Henlé, tubule collecteur), mais aussi dans le cerveau. Ils y jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de membrane ainsi que dans la régulation de l'homéostasie potassique. Des mutations dans le gène codant pour le canal Kir1.1 ont été associées au syndrome de Bartter (hyperprostaglandine E syndrome) (Schulte *et al.*, 1999; Zuo *et al.*, 2020).

**Kir4.X et Kir5.1 :**

Cette sous-famille est surtout exprimée dans les cellules gliales et du côté basolatéral des cellules rénales du tubule contourné distal. Ils y jouent un rôle dans le contrôle de l'homéostasie potassique. Kir5.1 n'as pas de courant à l'état d'homéomère, il s'associe avec Kir4.1 et 4.2 sous forme d'hétéromère ce qui leur confère de nouvelles propriétés biophysiques(González *et al.*, 2012).

Au niveau pathologique, des modifications de l'expression de Kir4.1 dans les cellules gliales constituent une marque de l'évolution des lésions de sclérose en plaque(Schirmer *et al.*, 2014).

**Kir7.1 :**

Le canal Kir7.1 génère des courants très faibles qui sont activés par PIP2.

Le canal Kir7.1 est retrouvé dans les épithéliums où il s'exprime dans les mêmes domaines membranaires que la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, donc principalement dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales telles que celles de l'intestin grêle, les cellules folliculaires thyroïdiennes et les tubules rénaux proximaux ou distaux(Vera *et al.*, 2020)

Une perte d'expression du canal Kir7.1 dans les photorécepteurs de la rétine a été décrite dans les processus conduisant à des défauts de vision et à la cécité (Roman *et al.*, 2018).

**2.2. Les canaux potassiques à quatre segments transmembranaires et deux domaines pores dits canaux de fond K<sub>2P</sub>**

a) Généralités

Décrits pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ketchum *et al.*, 1995), puis mis en évidence chez la drosophile (Goldstein *et al.*, 1996) et l'Homme (Lesage *et al.*, 1996), ces canaux potassiques à deux domaines pore ou K<sub>2P</sub>, sont encodés par 15 gènes différents chez les mammifères (Figure 11A) et sont subdivisés en 6 sous-familles selon leur homologie de structure et de fonction.

Les K<sub>2P</sub>se caractérisent par la présence de 4 domaines transmembranaires (M1-M4), de deux domaines formant le pore (P1 et P2) et d'une région extracellulaire importante reliant les domaines M1 et P1 (Figure 11B). Les domaines N- et C-terminaux ainsi que la boucle cytoplasmique reliant M2 et M3 jouent des rôles primordiaux dans la régulation des K<sub>2P</sub>. Etant donné que le filtre de sélectivité au potassium doit être composé de 4 domaines pores, ces canaux se dimérisent pour être fonctionnels.



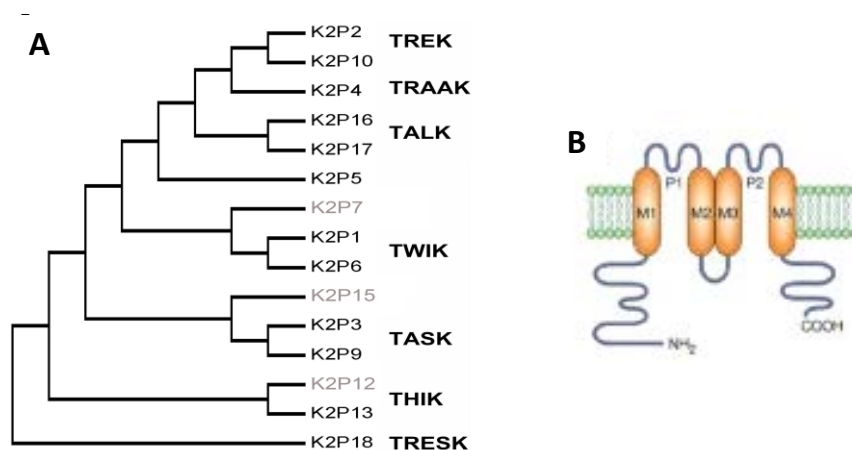


Figure 11 : Canaux potassiques à deux domaines pore. A) Arbre phylogénétique des 15 membres des K2P. B) Structure schématique des sous-unités K2P formées de 4 segments transmembranaires (M1 à M4) et deux domaines pore (P1 et P2). (Bayliss *et al.*, 2019; Choe, 2002)

A ce jour cette famille de canaux est subdivisée en 7 sous-familles :

- Les TWIK (pour Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying potassium channel)
- Les TREK (pour Twik-Related K<sup>+</sup> channel) et le TRAAK (pour Twik-Related Arachidonic Acid activated K<sup>+</sup> channel)
- Les TASK (pour Twik-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channel)
- Les TALK (Twik-related ALkalin pH activated K<sup>+</sup> channel)
- Les THIK (Twik-related Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channel)
- Les TRESK (Twik-RElated Spinal cord K<sup>+</sup> channel)

### 2.3. Les canaux potassiques dépendants du potentiel ou canaux voltage-dépendants

#### a) Généralités

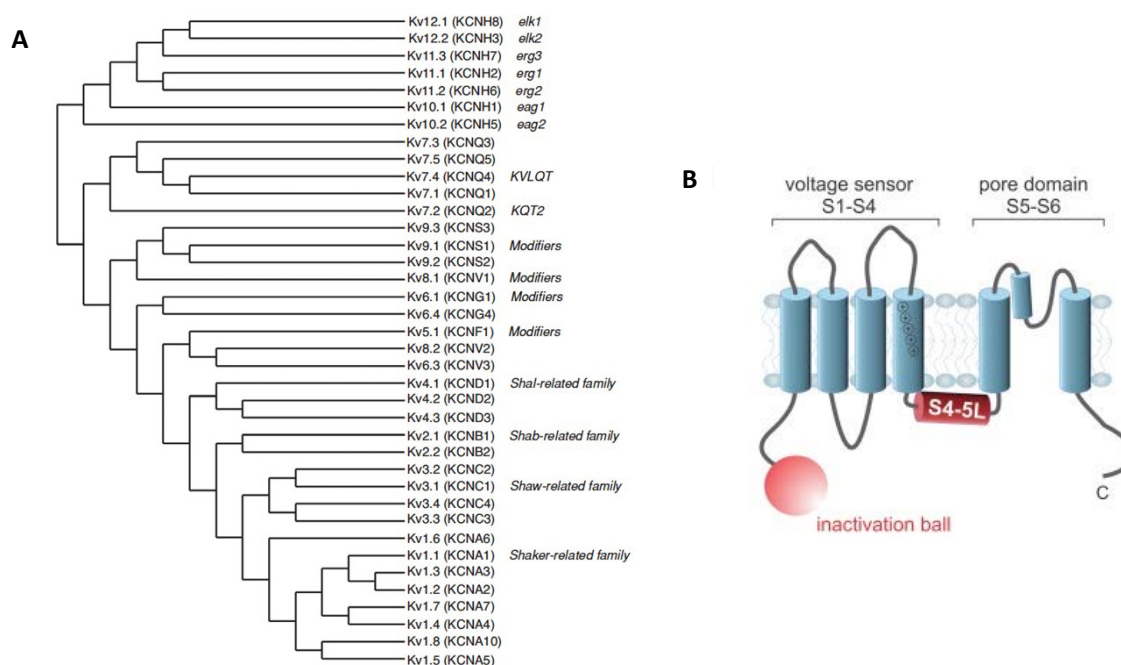
Décrits pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ketchum *et al.*, 1995), puis mis en évidence chez la drosophile (Goldstein *et al.*, 1996) et l'Homme (Lesage *et al.*, 1996), ces canaux potassiques Kv, sont encodés par 40 gènes différents chez l'Homme et sont subdivisés en 6 sous-familles selon leur homologie de structure et de fonction (figure 12A).

Ces canaux sont composés de 6 domaines transmembranaires et d'une boucle P. Ils forment des tétramères pour être fonctionnels. Les segments transmembranaires de tous les Kv montrent des similarités incluant un domaine sensible au voltage (*voltage-sensitive domain*: VSD) compris entre les segments S1 à S4, le segment 4 étant le senseur (Aggarwal and MacKinnon, 1996). Le domaine pore quant à lui est compris entre les segments S5 et S6. (Figure 12B).

Le contrôle de ces canaux par le voltage est conféré par la liaison entre le VSD et le pore du canal. La fonction primaire de ce domaine est d'exercer une action mécanique qui va modifier la conductance du pore. Cela va permettre d'ouvrir et de fermer ce dernier. Ce sont les charges positives

contenues dans le segment S4 qui vont permettre la transformation de l'énergie électrique en énergie mécanique.

Ces canaux sont inactifs au potentiel de repos et ne s'ouvrent que lors d'une dépolarisation dépassant leur seuil d'activation. La sortie massive de  $K^+$  qui en résulte permet la repolarisation de la membrane et le retour au potentiel de repos de la cellule.



**Figure 12 : Canaux potassiques voltage dépendants A) Les canaux potassiques voltages dépendants sont encodés par 40 gènes. B) Représentation schématique des sous-unités des canaux Kv : Les segments S1 à S4 forment le capteur de tension, et les segments S5 et S6 avec la boucle P forment le domaine pore. L'extrémité N-terminale contient le peptide boule d'inactivation. Chaque sous-unité est organisée en tétramère (Attali *et al.*, 2019; Blunck and Batulan, 2012)**

Enfin, deux types de courant sont induits par les canaux potassiques voltage dépendant :

- Courant Transitoire ou de type-A (IA)
- Les courants potassiques à rectification retardée (ID)

Grâce au séquençage, il a été proposé de diviser cette famille en 4 sous famille selon leur homologie de séquence :

*b) Les shakers ou Kv1.X (1 à 8):*

Ces canaux sont principalement exprimés dans le cerveau, mais aussi dans le coeur, le muscle squelettique, la rétine et le pancréas (Grandi *et al.*, 2017; Willis *et al.*, 2018).

*c) Les Shab ou Kv2.X (1 et 2), les Shaw ou Kv3.X (1 à 4) et les Shal ou Kv4.X (1 à 3) :*

Ils sont exprimés dans le cerveau, le muscle lisse, les poumons, le coeur, les testicules et le pancréas (Gutman *et al.*, 2005). Ces canaux peuvent générer des courants retardés ID (ex : Kv2.X) ou des courants transitoires IA (ex : Kv3.3).

d) La famille des KCNQ ou Kv7.X (1 à 5):

On les retrouve dans le coeur, le cerveau, le pancréas, la thyroïde, l'oreille interne, l'estomac, les muscles et les intestins. Ils y jouent un rôle important dans la dépolarisation des membranes et dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire. De nombreuses mutations sur les canaux de cette famille ont été décrites dans des maladies génétiques comme par exemple dans l'arythmie cardiaque, le diabète, la surdité congénitale ou encore l'épilepsie (Alaimo *et al.*, 2018).

Les courants natifs induits par KCNQ1 (Kv7.1) sont régulés par leur association avec une protéine auxiliaire  $\beta$ , KCNE1 (*K<sup>+</sup> voltage-gated channel subfamily member E1*).

e) La famille des Ether-a-go-go (Eag)

Cette famille a tout d'abord été découverte chez la drosophile sous le nom d'éther-à-go-go. Chez l'humain le nom du gène de cette famille est KCNH. Celle-ci est constituée de 3 sous-familles : Les Kv10, Kv11 et Kv12. Ils produisent un courant avec une activation lente et qui s'inactive très peu. Ils participent à la repolarisation du potentiel d'action dans le coeur et le cerveau.

Ces canaux sont exprimés principalement dans le cerveau, les myoblastes, l'utérus (González *et al.*, 2012).

hERG1 (Kv11.1) joue un rôle crucial dans le coeur où il génère des courants lentement activés et rapidement inactivés.

f) La famille des « Modifiers/Silencers » ou KvS

On compte dans cette famille 4 sous-groupes : Kv5.1, Kv6.X (1 à 6), Kv8.X (1 et 2) et Kv9.X (1 à 9). Ces canaux ne sont pas fonctionnels à l'état d'homotétramère (González *et al.*, 2012). Ils ne peuvent former un canal qu'en s'associant au Kv2.X et permettent de moduler leur cinétique d'activation et d'inactivation. Les KvS ont trois caractéristiques en commun. Tout d'abord, ils ont la même structure que les autres Kv (6 domaines transmembranaires, un segment S4 chargé et une séquence GYG au niveau du pore) mais ils ne peuvent pas former de canaux fonctionnels homomériques car ils sont retenus dans le réticulum endoplasmique. Les KvS s'hétéromérisent avec les Kv2 mais pas avec Kv1, Kv3 et Kv4 et en modulent leurs propriétés biophysiques. Par exemple, Kv6.1 déplace la voltage-dépendance de Kv2.1 d'environ 50mV vers des valeurs de potentiel plus hyperpolarisées, en facilitant la déphosphorylation calmoduline dépendante de Kv2.1 (Kramer *et al.*, 1998; Salinas *et al.*, 1997).

Alors que Kv2.1 est exprimé de manière ubiquitaire, les KvS montrent une expression plus restreinte laissant suggérer que les hétéromères Kv2/KvS ont une fonction tissu-spécifique.

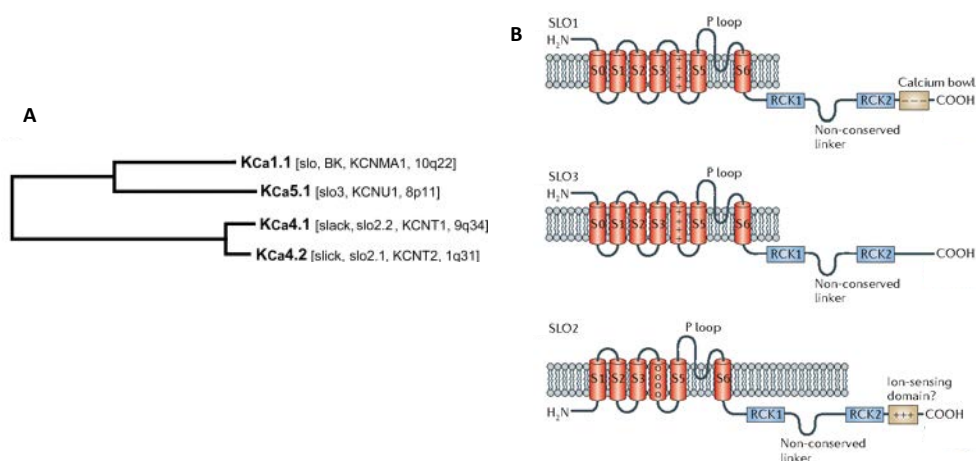
**2.4. Les canaux potassiques de la famille Slo**

Décrits pour la première fois chez la drosophile (Atkinson *et al.*, 1991) ces canaux potassiques sont encodés par 4 gènes différents chez les mammifères (Figure 13A).

Ces canaux se caractérisent par la présence de plusieurs domaines transmembranaires (6 ou 7) selon les gènes qui les encodent, mais d'un seul domaine pore.

Les canaux Slo1 (ou BKCa) et Slo3 (Figure 13B) sont composés de 7 segments transmembranaires et sont activés par un courant, grâce à un domaine senseur de courant (S1 à S4) situé entre le segment M0 et le domaine pore (S5-S6). Le canal Slo1 est également activé par le calcium grâce à la présence sur le segment S6 en C-terminal d'un domaine de réponse au calcium cytosolique.

Les canaux Slo2.x (Slo 2.1 et 2.2) sont composés de 6 segments transmembranaires et sont activés par le sodium et le chlore grâce à la présence sur le segment S6 en C-terminal d'un domaine senseur d'ions.



**Figure 13 : Les canaux potassiques de la famille Slo. A) 4 gènes codent les canaux Kca. B) Les sous-unités des canaux Slo1 et Slo3 sensibles au courant sont composés de 7 segments transmembranaires (S0 à S6) avec un domaine pore (P loop). Le canal Slo1 ou BKCa contient un domaine d'activation par le calcium (Calcium bowl). Les sous-unités Slo2.x (2.1 et 2.2) sont composées de 6 segments transmembranaires et un domaine pore. Ces canaux ont un domaine de sensibilité aux ions Cl<sup>-</sup>. (Aldrich *et al.*, 2019; Salkoff *et al.*, 2006)**

Le canal Slo1 est exprimé principalement dans le cerveau (où il se trouve co-exprimé avec les canaux calciques voltage dépendant), mais aussi dans les cellules musculaires lisses, dans les cellules  $\beta$  des ilots de Langerhans, et dans le rein (González *et al.*, 2012).

Il a été également montré que ce canal ainsi que Slo2 sont exprimés dans la membrane interne de la mitochondrie jouant un rôle dans l'absorption du potassium par la mitochondrie et de protection cellulaire (Wojtovich *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2002).

## 2.5. Les canaux potassiques activés par le calcium

### a) Généralités

Dans le paragraphe précédent, nous avons évoqué l'activation du canal Slo1 par le calcium cytosolique. Bien que ce canal n'appartienne pas à la famille des canaux de faible conductance, il est admis qu'en regard de leur conductance les canaux potassiques activés par le calcium, KCa sont classés en 3 sous-familles selon leur conductance :

- ✓ BKCa (*Big-conductance*, KCa) : forte conductance

- ✓ IKCa (*Intermediate-conductance, KCa*) : conductance intermédiaire
- ✓ SKCa (*Small-conductance, KCa*) : faible conductance

Le canal IKCa est codé par le gène *KCNN4* situé sur le locus 19q13.31

Trois isoformes de SKCa ont été décrites, SK1, SK2 et SK3. Les gènes respectifs codant ces canaux sont situés sur des chromosomes différents chez l'homme :

- *KCNN1* (gène codant SK1) est situé sur le locus : 19p13.1
- *KCNN2* (gène codant SK2) sur le locus 5q22.3
- *KCNN3* (gène codant SK3) sur le locus 1q21.3(Wei *et al.*, 2005).

Les canaux SKCa ont des répartitions tissulaires variables (Girault *et al.*, 2012). Ainsi, SK1 bien que quasi-exclusivement exprimé dans le tissu neuronal, a été démontré comme exprimé dans le pancréas et dans le coeur. SK2 et SK3, bien que fortement exprimés dans le système nerveux central sont également exprimés dans les tissus périphériques.

D'un point de vue fonctionnel, l'activité des canaux SKCa, tout comme le canal IKCa, n'est pas dépendante du voltage. Elle intervient en réponse au calcium cytosolique *via* la calmoduline qui va se lier au domaine C-terminal des sous-unités  $\alpha$  du canal et permettre ainsi son ouverture (Kshatri *et al.*, 2018).

Sur le plan structural, les canaux SKCa sont formés de 4 sous-unités alpha, constituées chacune de 6 segments transmembranaires (S1 à S6), et de deux extrémités C- et N-term intracellulaires. Les canaux SKCa possèdent une structure très conservée au cours de l'évolution et on retrouve ainsi 80 % d'homologie entre les acides aminés qui composent les 6 segments transmembranaires de SK1, SK2 et SK3 (Girault *et al.*, 2012) (Figure 14)

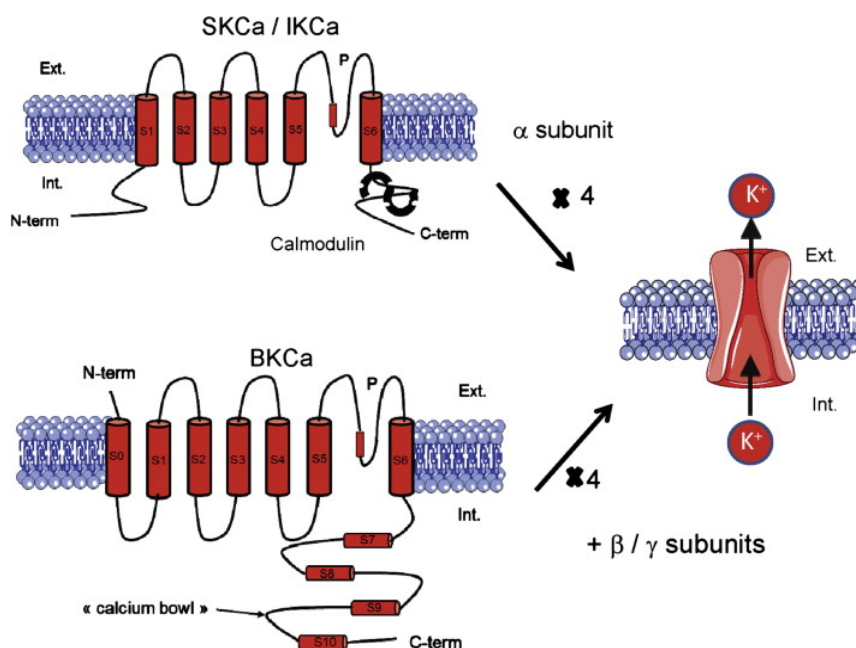


Figure 14 : Représentation schématique des canaux SKCa (Guéguinou *et al.*, 2014).

## IV- Implication des canaux potassiques activés par le calcium dans les processus de tumorigenèse

### 1. Généralités sur l'implication des canaux potassiques dans le processus de progression tumorale

De nombreux travaux réalisés à ce jour montrent une implication des canaux potassiques qui se retrouvent sur ou sous-exprimés, dans le processus de tumorigenèse (Tableau 2) (Huang and Jan, 2014).

Par exemple il a été montré qu'une expression élevée de Kv1.3 est détectée dans un certain nombre de tumeurs malignes humaines, y compris le cancer du sein, du côlon et de la prostate (Comes *et al.*, 2013). De même des études ont permis d'identifier qu'une expression élevée de Kv11.1 (HERG) constitue à la fois un marqueur des tumeurs solides mais aussi des leucémies myéloïdes aiguës (Jehle *et al.*, 2011; Pillozzi *et al.*, 2002). D'autre part, la surexpression de Kv10.1 (EAG1) est trouvée dans plus de 80% des types de cancer humains de divers organes (Hemmerlein *et al.*, 2006). La surexpression du canal potassique GIRK1 (KCNJ3) à rectification entrante activée par la protéine G est corrélée à la présence et au nombre de ganglions métastatiques dans certains cancers du sein (Stringer *et al.*, 2001). La surexpression d'une isoforme d'épissage spécifique du canal BK est en corrélation avec le grade de malignité de certains gliomes (Liu *et al.*, 2002). Le canal K2P KCNK9 est surexprimé dans les cancers du sein et du poumon (Mu *et al.*, 2003). Le tableau 2 présente un résumé détaillé de l'expression des canaux potassiques (Huang and Jan, 2014) impliqués dans différents cancers.

Cancer type	Channel gene																						
	Kv1.1 KCNA1	Kv1.3 KCNA3	Kv1.5 KCNA5	Kv3.4 KCNK4	Kv4.1 KCNK1	Kv7.1 KCNQ1	Kv10.1 KCNH1	Kv10.2 KCNH5	Kv11.1 KCNH2	K <sub>cs</sub> 1.1 KCNMA1	K <sub>cs</sub> 2.3 SK3	K <sub>cs</sub> 3.1 IK1	Kir2.2 KCNJ12	Kir3.1 KCNJ3	Kir3.4 KCNJ5	Kir4.1 KCNJ10	Kir6.1 KCNJ8	Kir6.2 KCNJ11	K2P2.1 KCNK2	K2P3.1 KCNK3	K2P5.1 KCNK5	K2P9.1 KCNK9	
Adrenal																							
Blood																							
Bone																							
Brain																							
Breast																							
Cervix																							
GI tract																							
Head and neck																							
Kidney																							
Lung																							
Lymphoma																							
Melanoma																							
Ovary																							
Pancreas																							
Prostate																							
Sarcoma																							
Thyroid																							
Uterine																							

**Tableau 2 : Tableau non exhaustif de l'expression de divers canaux potassiques impliqués dans le cancer. Les cases rouges indiquent qu'une surexpression des canaux est le plus fréquemment décrite et que ceux-ci soutiennent le processus de progression tumorale. Les cases vertes indiquent que la sous-expression du canal est corrélée à la malignité tumorale et à l'agressivité clinique. La case bleue indique la présence de mutations somatiques du gène KCNJ5 dans les adénomes surrénaliens (Choi *et al.*, 2011).**

Des études ont montré que l'inhibition pharmacologique ou l'extinction moléculaire des canaux potassiques réduit la croissance de plusieurs types de cancer (Urrego *et al.*, 2014). Ainsi il a été montré dans une étude récente que la surexpression du canal Kir2.1 dans les cellules cancéreuses de l'estomac soutenait la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et le processus de dissémination métastatique de manière indépendante des flux potassique (Ji *et al.*, 2018). Ces travaux montrent que le canal Kir2.1 interagit avec la serine/threonine-protein kinase 38 (STK38) et inhibe l'ubiquitination et ainsi la dégradation de la protéine MEKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2* MAP3K2). Celle-ci est alors accompagnée d'une activation de la voie MEK1/2-ERK1/2-SNAIL impliquée dans les processus de la TEM et de la dissémination métastatique.

Néanmoins, d'autres travaux tendent à montrer que les canaux potassiques joueraient un rôle «permissif» permettant de réguler différents mécanismes de la tumorigenèse tels que la prolifération et la migration, mais aussi en bloquant les mécanismes d'induction de l'apoptose.

### **2. Implication des canaux potassiques activés par le calcium dans la tumorigenèse**

Tous comme pour les autres membres de la famille des canaux potassiques, la littérature montrent une contribution des canaux potassiques activés par le calcium dans le processus de tumorigenèse.

#### **2.1. Implication du canal Slo1 ou BKCa**

Le canal BKCa est un canal qui a été très largement décrit dans la littérature comme étant impliqué dans le processus de tumorigenèse.

Ainsi des études ont montré que ce canal favorise la prolifération de cellules de gliomes (Weaver *et al.*, 2004). Dans leurs travaux, Weaver *et al.* ont montré qu'en utilisant un inhibiteur pharmacologique spécifique du canal BKCa (l'iberiotoxine) il existait après traitement un blocage en phase S du cycle cellulaire accompagnée par la suite d'une mort cellulaire.

Dans les travaux menés par Michael B McFerrin et collaborateurs ont montré sur des cellules de glioblastome qu'une induction de la voie extrinsèque de l'apoptose par TRAIL (*TNF- $\alpha$ -Related Apoptosis-Inducing Ligand*) était médiée par le canal BKCa qui contribue à la diminution du volume cellulaire qui est une des étapes du processus d'apoptose (McFerrin *et al.*, 2012).

Enfin le canal BKCa a été montré comme étant impliqué dans le processus de croissance tumorale et de dissémination métastatique dans le cancer de la prostate (Du *et al.*, 2016). Dans cette étude ils ont montré que l'expression de BKCa est directement corrélée à l'indice Ki67 marqueur de la prolifération cellulaire. *In vitro*, ils ont ainsi montré qu'une extinction par shRNA du canal entraînait une diminution de la croissance tumorale.

De plus, leurs travaux ont mis en évidence que l'action du canal était principalement médiée par la formation d'un complexe fonctionnel avec l'intégrine  $\alpha\beta 3$  soutenant les processus de croissance tumorale mais aussi la migration cellulaire.

### 2.1. Implication du canal IK

La conductance intermédiaire a été décrite dans différents types de cancer en présentant selon la pathologie différents rôles dans le soutien de la tumorigenèse.

Ainsi, dans leurs travaux, Michael B McFerrin et collaborateurs ont montré sur des cellules de glioblastome qu'une induction de la voie intrinsèque de l'apoptose par la staurosporine était médiée par le canal IKCa qui contribue à la diminution du volume cellulaire par efflux de potassium qui est une des étapes du processus d'apoptose (McFerrin *et al.*, 2012).

En 2017, des travaux menés sur l'étude de l'implication de la conductance IKCa dans des lignées épithéliale et cancéreuse de sein (Thurber *et al.*, 2017) ont permis de conforter le fait qu'une surexpression de cette conductance conduisait à un comportement hautement agressif des cellules de carcinomes mammaires. En effet leur travail a permis dans un modèle *in vivo* de carcinome mammaire qu'une surexpression d'IKCa conduit à une progression tumorale accrue.

D'autre part le canal IKCa a été décrit dans la littérature comme étant impliqué dans un phénomène de résistance aux rayonnements ionisant dans le traitement des glioblastomes. (Stegen *et al.*, 2015). *In vitro*, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique (TRAM-34, spécifique de la conductance IKCa) mais aussi à l'aide d'extinction moléculaire par shRNA, il a été ainsi montré que l'extinction du canal IKCa contribuait à induire après sensibilisation aux rayonnements ionisants un blocage des cellules en phase G2/M et une augmentation des cassures double brin. Ces résultats ont de plus été confortés à l'aide d'un modèle *in vivo* de glioblastome qui montre une sensibilisation à ces rayonnements après traitement avec l'inhibiteur TRAM-34.

Cette conductance a également été décrite comme étant impliquée dans le processus de prolifération cellulaire (Bonito *et al.*, 2016). Dans leurs travaux, cette équipe a montré l'expression d'un canal fonctionnel dans des cellules d'adénocarcinome du pancréas. Par extinction moléculaire (siRNA) mais aussi à l'aide d'inhibiteur pharmacologique (TRAM-34, clotrimazole et DC-EBIO) une diminution de l'activité du canal associée à une diminution de la prolifération cellulaire. Cette étude relève néanmoins le rôle ambigu de cette conductance dans le phénomène de migration.

### 2.2. Implication du canal SK2

Le canalSK2 a été décrit comme étant exprimé par des cellules de mélanome (Tajima *et al.*, 2006). Tandis qu'en condition de normoxie, le canal de conductance intermédiaire IK est exprimé, cette équipe a démontré qu'en condition hypoxique, l'expression du canal SK2 était augmentée et promouvait ainsi la prolifération cellulaire. Par approche pharmacologique (apamine) ils ont montré que la prolifération cellulaire était fortement diminuée et encore plus en condition hypoxique. D'autre travaux montrent d'une surexpression de KCNN2 dans d'autres types cellulaires de mélanome (D'Arcangelo *et al.*, 2019) et que celle-ci est également associée à une augmentation de la prolifération cellulaire. Dans cette étude les auteurs ont montré par des méthodes d'extinction



moléculaire (siRNA) et à l'aide d'inhibiteur pharmacologique (Miconazole) une forte diminution de la prolifération cellulaire des lignées de mélanome lors de l'inhibition de SK2.

Dans des cellules leucémiques (Jäger *et al.*, 2000). Cette conductance joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Récemment, l'analyse de bases de données publique permettant l'accès à des études par RNAseq (Séquençage haut débit) a montré que le canal SK2 est surexprimé dans le tissu tumoral proximal du cancer colorectal (Ibrahim *et al.*, 2019) mais son rôle ne semble pas encore clairement établi.

### 2.3. Implication du canal SK3

Le canal SK3, exprimé dans plusieurs cellules cancéreuses comme les cellules de cancer du sein (Potier *et al.*, 2006), de mélanome (Chantome *et al.*, 2009), et de cancer du côlon (Potier *et al.*, 2010), joue un rôle crucial dans la migration cellulaire et donc dans le développement métastatique.

Il a ainsi été identifié, dans des cellules cancéreuses, des complexes, associant au sein de nanodomains (enrichis en cholestérol, sphingolipides et gangliosides) le canal SK3 à des canaux calciques ORAI et/ou TRP, et régulant l'entrée de calcium (Figure 15A) et la signalisation calcique contrôlant alors la migration cellulaire (Figure 15B) et le développement de métastases osseuses (Figure 15C) (Guéguinou *et al.*, 2015).

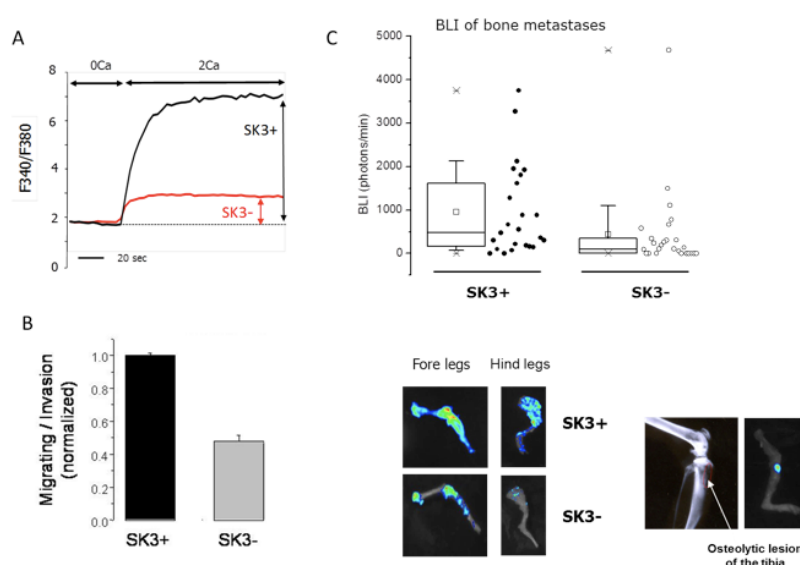


Figure 15 : L'extinction du canal SK3 diminue l'entrée constitutive de Calcium (A), les processus de migration et d'invasion (B) et diminue *in vivo* la formation de métastases (C).

### 2.4. Implication du canal SK1

Comme nous venons de le voir les canaux potassiques, et plus particulièrement les canaux potassiques activés par le calcium (SK2, SK3, et IKCa, et BKCa), sont fortement impliqués dans le processus de tumorigenèse. En soutenant les mécanismes de prolifération cellulaire, de dissémination métastatique, en inhibant l'apoptose, et en étant potentiellement impliqués dans des phénomènes de

résistance aux modalités thérapeutiques (chimiothérapie, radiothérapie,...) ceux-ci permettent de contribuer à la progression tumorale.

Néanmoins, à ce jour, une modulation de l'expression du canal SK1 n'a été décrite dans aucun type de cancer.

### V- Objectifs du projet

En 2017, dans le cadre d'un projet émergent du Cancéropôle Grand Ouest du réseau « Canaux ioniques et cancer », j'ai été amené à étudier l'expression de plusieurs canaux potassiques activés par le calcium sur des lignées cellulaires d'ostéosarcomes, de sarcomes d'Ewing et de cellules souches mésenchymateuses différenciées ou non *in vitro* en ostéoblastes.

Les résultats encourageants obtenus ont conduit à l'obtention en 2018 d'un financement INCa associant 4 partenaires des universités de Nantes, (Dr Franck VERRECCHIA), de Tours (Pr Christophe VANDIER), Orléans (Pr Sylvain ROUTIER) et Brest (Pr Paul-Alain JAFFRES).

C'est dans ce contexte que j'ai été amené à étudier les mécanismes de régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1, et son rôle potentiel dans le développement des sarcomes d'Ewing.

Pour mener à bien ce travail, les objectifs du projet étaient donc :

- D'étudier l'expression des canaux SK1 dans des biopsies de sarcome d'Ewing.
- D'étudier le rôle potentiel d'EWS-FLI1 dans la régulation de l'expression de SK1.
- De tester *in vitro* le rôle des canaux SK1 par des approches d'extinction de fonction (shRNA) dans certains processus clés du développement tumoral comme la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires.
- D'étudier *in vivo* le rôle de SK1 sur la croissance des sarcomes d'Ewing dans des modèles murins mimant la pathologie.
- D'étudier *in vivo* les effets de l'extinction de SK1 dans les cellules de sarcome d'Ewing sur le microenvironnement tumoral comme le remodelage osseux et l'angiogenèse tumorale.
- De tester les modulateurs des canaux SK1 déjà identifiés seul ou en combinaison avec des thérapies actuellement utilisées dans le cadre des sarcomes d'Ewing.

# **MATERIELS ET METHODES**

## I- Culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'ostéosarcomes, obtenues auprès de l'ATCC® (*American Type Culture Collection*), et les lignées de Sarcome d'Ewing, données par le Dr Olivier DELATTRE (Institut Curie, Paris), sont cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité, avec 5% de CO<sub>2</sub> dans le milieu approprié (Tableau 3) complémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal ; Lonza) et un mélange d'antibiotiques (1% de Penicillin-Streptomycin, Lonza).

La lignée de sarcome d'Ewing A673 transfectée stablement avec un shRNA dirigé contre EWS-FLI1 et inductible à la doxycycline (lignée ASP14) est cultivée en présence ou absence de 1µg/mL de doxycycline.

Tumeur	Lignée	Milieu de culture	Origine
Ostéosarcome	U2OS	DMEM	Lignée issue d'un ostéosarcome peu différencié du tibia d'une jeune fille de 15 ans réalisé en 1964
	HOS	DMEM	Prélèvement du fémur d'une adolescente de 13 ans. Cellules transformées par un traitement au N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine qui augmente le potentiel cancérigène
	KHOS	DMEM	Cellules dérivées des HOS, transformées avec le Kirsten murine sarcoma virus (Ki-MSV)
	G292	DMEM	Prélèvement issu d'une jeune fille de 9 ans
	CAL72	DMEM	Prélèvement datant de 1989 d'une tumeur résistante à la chimiothérapie, du genou gauche d'un jeune garçon de 10 ans
	143B	DMEM	Prélèvement issu d'une adolescente de 13 ans
	MG63	DMEM	Prélèvement issu d'un adolescent de 14 ans
Sarcome d'Ewing	RDES	DMEM	Prélèvement datant de 1984 d'un humérus d'un homme de 19 ans
	EW7	DMEM	Prélèvement réalisé sur un épanchement pleural (site métastatique) d'un sarcome d'Ewing provenant d'une jeune femme de 20 ans
	SKES-1	DMEM	Biopsie datant de 1971 d'un homme de 18 ans. Fort taux de facteur de croissance et de différenciation
	TC71	RPMI	Prélèvement datant de 1981 d'un humérus d'un homme de 22 ans
	A673	DMEM	Prélèvement issu d'une adolescente de 15 ans
	MHHES-1	RPMI	Prélèvement issu d'un jeune garçon de 12 ans
	EW24	DMEM	Inconnu
	ASP 14	DMEM	Cellules dérivées des A673, stablement transfectées avec un shRNA dirigé contre EWS/FLI1 inductible avec 1µg/mL de doxycycline.

Tableau 3 : Résumé des lignées cellulaires utilisées

## II- Extraction d'ARN, transcription inverse, et PCR quantitative

### 1. Extraction des ARN totaux

Les cellules cultivées jusqu'à confluence, sont rincées 2 fois avec du PBS 1X, puis les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey Nagel) selon le protocole préconisé par le fabricant. Cette technologie d'extraction utilise des colonnes contenant une membrane de silice ayant des propriétés de liaison sélective des ARNs et un système de tampons très concentrés en sels qui permettent la fixation d'une quantité d'ARN (supérieure à 200 bases) allant jusqu'à 200µg. Une étape utilisant une colonne contenant également une membrane de silice permet d'éliminer toute trace d'ADN génomique (retenus dans la membrane par leurs hauts poids moléculaires) pour prévenir toute trace de contamination par celui-ci lors de l'étape de PCR.

Après extraction les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, ThermoFisher).

## 2. Transcription inverse

La transcription inverse (RT) permettant d'obtenir de l'ADNc à partir des ARNs extraits, est réalisée à l'aide du kit *Maxima H Minus First Strand cDNASynthesis Kit* (ThermoFisher). Des oligonucléotides de désoxy-thymidine « Oligo(dT)18 » se fixent au niveau de la queue polyA des ARNs messagers. L'enzyme utilisée est la *Maxima H minus reverse transcriptase*, ayant une grande stabilité thermique et permettant de rétrotranscrire des ARNm de grande taille.

Pour ce faire, 1µg d'ARN total est mis en présence de 1µL d'Oligo (dT)18 à 0,5µg/µL, 1µL de dNTPs 10mM (1mM final) et d'eau « RNase free » (sans RNase, ribonucléase) pour obtenir un volume final de 15,5µL. Ce mix est chauffé 5 minutes à 65°C, puis mis sur glace afin d'effectuer un choc thermique fixant l'hybride ARNm-OligodT. 4µL de tampon de réaction 5X (1X final) et 0,5µL de Maxima H Minus sont ensuite ajoutés. La réaction de transcription inverse se fait pendant 30 minutes à 50°C. Pour arrêter cette réaction, les échantillons sont placés 5 minutes à 85°C. Ces derniers sont alors conservés à -20°C jusqu'à l'étape suivante.

## 3. PCR quantitative

Les produits de RT sont dilués au 1/5 et la réaction de PCR est réalisée avec 2µL de cDNA et 8µL d'un mix contenant les primers (300nM final par amorce, Tableau 4) et le SYBR™ Green Select Master (1X final, Life Technologies).

Amorces	Séquence des amorces (5' → 3')	Tm calculated (°C)	Concentration -µM-
hKCNN1 Qr	CAGTCATCAGCCCCGTTGT	60	100
hKCNN1 Qf	CACCAAGGAGTCTCTGTACTC	64	100
hKCNN2 Qr	AGGAATACAGCGACGCTTG	62	100
hKCNN2 Qf	ATGTTCCGGCATCGTGGTCAT	60	100
hKCNN3 Qr	CACGAAGAGCTGGACTTCAC	62	100
hKCNN3 Qf	GTTATGGTGATAGAGACC	52	100
hORAI1 Qr	TGCTGATCATGAGCGAAAC	60	100
hORAI1 Qf	GCTGACCACGACTACCCA	62	100
hORAI2 Qr	CACTCATGGTGGGAGCCAG	62	100
hORAI2 Qf	CAGCTCCGGGAAGGAACG	60	100
hORAI3 Qr	ACCATCCCTTCTGCAAGTGG	62	100
hORAI3 Qf	ACCAAGGCATTGGTCTAGC	62	100
hGAPDH Qr	GGTGCAGGAGGCATTGCT	58	100
hGAPDH Qf	TGGGTGTGAACCATGAGAAGTATG	70	100
hEWS-FLI1 Qr	GAGGCCAGAATTCATGTTATTGC	66	100
hEWS-FLI1 Qf	GCCAAGCTCCAAGTCAATATAGC	68	100

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la qPCR

Afin d'analyser les résultats obtenus par PCR, deux méthodes de calcul ont été retenues :

- La première consiste à utiliser les  $\Delta CT$  obtenus en normalisant avec la GAPDH pour chaque échantillon biologique et l'exprimer sous forme de  $2^{-\Delta CT}$ .

$$\Delta CT = CT(\text{gène étudié}) - CT(\text{GAPDH})$$

Cette méthode permet de déterminer le niveau d'expression de chaque gène analysé de manière indépendante.

- La seconde méthode consiste à comparer des  $\Delta\Delta CT$ . A partir des CT obtenus ; des  $\Delta CT$  ont été calculés puis des  $\Delta\Delta CT$ , selon le principe suivant :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta CT(\text{échantillon}) - \Delta CT(\text{Contrôle})$$

L'expression normalisée et relative est ensuite exprimée sous forme  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cette méthode permet une comparaison intergroupe avec une condition contrôle (lignée ayant une faible expression ou une condition sans traitement). L'expression normalisée et relative est ensuite exprimée sous forme  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### III- Western blot

#### 1. Extraction protéique

L'extraction protéique a été réalisée dans du tampon SDS (SDS 1% ; pH 7,4 ; Tris 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM) en présence de benzonase (endonucléase, Sigma) diluée au 1/500ème. Pour cela, 100  $\mu$ L du mix précédent ont été ajoutés sur les cellules congelées à sec dans le but de décoller les cellules et de les lyser. Les lysats protéiques ont ensuite été soniqués durant 3 cycles à forte intensité (30 sec ON / 30 sec OFF). Les lysats sont ensuite centrifugés 10min à 13000rpm et les surnageants transférés en tube de 1,5mL.

Par la suite, un dosage au sulfate de cuivre BCA (Bicinchoninic Acid Assay) des protéines extraites a été effectué, à l'aide d'une gamme étalon de BSA (Bovin SerumAlbumin ; Sigma) allant de 0  $\mu$ g/mL à 1000  $\mu$ g/mL. Le réactif BCA utilisé a été préparé par dilution au 1/50ème du sulfate de cuivre dans de l'acide bicinchoninique (Sigma). La lecture du dosage a été effectuée sur l'appareil Victor (Perkin Elmer) par mesure de DO à 570 nm.

#### 2. Préparation des échantillons et migration

Les échantillons ont été dilués avec du tampon SDS, de telle sorte à charger 50  $\mu$ g (pour SK1) ou 10 $\mu$ g (pour FLI1, HA, et Flag) de protéines dans le gel. Du bleu de chargement (Laemmli 4X : Tris pH 6.8 (200mM), 8% SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), 40% de Glycérol, 0.04% de bleu de bromophénol, 20% de  $\beta$ -mercaptoéthanol) a ensuite été dilué au quart dans ces échantillons, qui ont par la suite été dénaturés par action de chauffage à 95°C durant 9 minutes. Les échantillons protéiques ont ensuite été déposés sur un gel de polyacrylamide, dans le but d'être séparés par électrophorèse (SDS-PAGE). Ils ont migré dans un premier temps dans un gel de concentration ou « stacking » à 5% de

polyacrylamide qui permet d'ajuster les protéines sur un même front de migration, pour qu'elles puissent rentrer en même temps dans le gel de séparation, ou « resolving » à 10% (pour SK1, FLAG, et HA) ou 12% (pour EWS-FLI1) d'acrylamide. La migration a été faite à voltage constant de 70 V dans un tampon de migration (Tris/Glycine 1X ; SDS 0,1% ; eau).

### 3. Transfert

Une fois les protéines séparées dans le gel, elles ont été transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidènefluorure), préalablement activée par du méthanol, par transfert humide en tampon de transfert (Tris/Glycine 1X ; Méthanol 20%) à 15V sur la nuit.

### 4. Saturation

Après transfert, la membrane a été lavée 3 fois durant 5 minutes dans du TBS Tween 0,05%, avant d'être saturée 1 heure en solution de blocage (Odyssey Blocking Buffer, Li-Cor), sous agitation lente, permettant le blocage des sites de liaison aspécifiques.

### 5. Incubation des anticorps

Par la suite, la membrane a été mise en présence des couples d'un anticorps primaires dilués en solution de saturation, contenant l'anticorps dirigé contre la protéine cible et un second anticorps dirigé contre une protéine de référence pour la normalisation. Les choix des associations est fait en prenant soin d'avoir un couple avec deux espèces différentes.

Cette première incubation a été faite sous agitation lente, durant toute une nuit à 4°C. Suite à cette étape, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin, couplés à un fluorochrome (respectivement vert 800CW et rouge 680RD) et dilués dans la solution de blocage, pendant 1 heure, sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Cible	Clonalité	Espèce	Dilution	Fournisseur	Référence
SK1	Polyclonal	Lapin	1/200	Alomon Labs	APC-039
Fli1	Polyclonal	Lapin	1/500	Abcam	ab15289
HA	Monoclonal clone (C29F4)	Lapin	1/1000	Cell Signaling Technology	3724S
Flag	Monoclonal clone (M2)	Souris	1/1000	Sigma	F3165
$\beta$ -Actine	Monoclonal clone (8H10D10)	Souris	1/10000	Cell Signaling Technology	3700S
GAPDH	Monoclonal clone (14C10)	Lapin	1/1000	Cell Signaling Technology	2118S
Anti-IgG de lapin 680RD (rouge)	Polyclonal	Chèvre	1/10000	Li-Cor	926-68071
Anti-IgG de lapin 800CW (vert)	Polyclonal	Chèvre	1/10000	Li-Cor	926-3221
Anti-IgG de souris 680RD (rouge)	Polyclonal	Chèvre	1/10000	Li-Cor	926-68070
Anti-IgG de souris 800CW (vert)	Polyclonal	Chèvre	1/10000	Li-Cor	926-32210

Tableau 5 : Références et sources et des anticorps primaires et secondaires utilisés

Trois lavages de la membrane ont de nouveau été effectués, avec du TBS Tween 0,05%. Les dilutions et les provenances des anticorps primaires et secondaires sont détaillées dans le tableau 5.

## 6. Révélation

La révélation de la membrane a été effectuée à l'aide de l'appareil Odyssey FC de chez Li-Cor. L'acquisition des images a été permise par le logiciel Image Studio et le traitement par Image J et par Image Studio.

La quantification est réalisée en calculant le ratio signal de l'antigène (niveau de gris) sur signal protéine de référence  $\beta$ -Actine).

## IV- Transfection transitoire : extinction d'EWS-FLI1 par siRNA

Les cellules sont ensemencées en plaque de 6 puits afin d'obtenir 24h après une confluence comprise entre 30 et 50%.

Le lendemain le milieu est renouvelé sans l'antibiotique, et la transfection est réalisée avec les siRNA EWSR1 (ON-TARGETplus Human EWSR1 siRNA, SMARTpool, Dharmacon, L-005119-02-0010) ou siRNAscramble (ON-TARGETPlus Non-targeting Control Pool, Dharmacon, D-001810-10-20) pour une concentration finale de 0,03 $\mu$ M en utilisant comme agent de transfection la Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX (Life Technologies, 13778-150).

48h après transfection, chaque puit est lavé au PBS 1X, les cellules sont décollées et transférées en tube de 1,5mL. Après centrifugation, les culots sont congelés à sec.

Les ARN sont ensuite extraits, rétro-transcrits, et la PCR quantitative est réalisée avec les couples d'amorces de *KCNI1*, d'EWS-FLI1, et de la GAPDH selon la procédure explicitée précédemment.

Les résultats sont ensuite analysés comme décrit précédemment et exprimés sous forme  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## V- Transfection transitoire : étude de vecteurs « gène rapporteur »

### 1. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 dans les lignées d'ostéosarcomes, de sarcomes d'Ewing et ASP14

Les cellules sont ensemencées en plaque de 24 puits afin d'obtenir 24h après une confluence comprise entre 50 et 70%. 24h après, les milieux sont renouvelés et la transfection est réalisée avec 250ng de plasmide pSK1-lux (Genecopoeia, ref. HPRM44187) dont le promoteur de SK1 est situé en amont de la région codant la luciférase Gaussia et 125ng de plasmide pRLTK-lux codant la luciférase Renilla (plasmide de normalisation) en présence de 1,5  $\mu$ L de JetPEI (transfectant) et 100 $\mu$ L de NaCl (150mM). 48h après, les surnageants sont collectés et stockés à -20°C et les cellules sont congelées à sec.



La lecture de l'activité luciférase est réalisée sur les surnageants (Luciférase Gaussia ; kit Genecopoeia, ref. LF-062), ainsi que sur les extraits réalisés à partir des cellules congelées à sec (Luciférase Renilla ; kit Active Motif, ref. 32031).

L'activité de la luciférase Gaussia est normalisée avec l'activité de la luciférase Renilla pour chaque échantillon.

## **2. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 après extinction d'EWS-FLI1 par siRNA dans la lignée A673**

Les cellules sontensemencées en plaque de 24 puits afin d'obtenir 24h après une confluence comprise entre 30 et 50%. Le lendemain le milieu est renouvelé sans l'antibiotique, et la transfection est réalisée avec lessiRNA EWSR1 (ON-TARGETplusHuman EWSR1 siRNA, SMARTpool, Dharmacon,L-005119-02-0010) ou siRNAscramble (ON-TARGETPlus Non-targeting Control Pool, Dharmacon, D-001810-10-20) pour une concentration finale de 0,03 $\mu$ M en utilisant comme agent de transfection la Lipofectamine<sup>®</sup>RNAiMAX (Life Technologies, 13778-150).

72h après transfection chaque puit est lavé au PBS 1X, les cellules sont décollées et immédiatement transférée en plaque de 12 puits. Le lendemain, la transfection est réalisée avec le plasmide pSK1-Lux comme mentionnée en IV-1 pour 48h.

L'activité de la luciférase Gaussia est normalisée avec l'activité de la luciférase Renilla pour chaque échantillon. Les résultats sont normalisés par rapport à l'activité luciférase du promoteur de la condition siRNAscramble.

## **3. Etude de la réponse transcriptionnelle du promoteur de SK1 dans la lignée COS-7 co-transfectée avec des doses croissantes de vecteur vide et/ou de surexpression d'EWS-FLI1**

### **3.1. Plasmides utilisés**

Afin d'étudier la réponse transcriptionnelle du promoteur de *KCNN1* (pSK1-Lux) nous avons réalisé une gamme de plasmide d'expression d'EWS-FLI1 (Figure 16) et de vecteur vide (Figure 17) correspondant au plasmide dans lequel a été cloné la séquence codante de la protéine de fusion EWS-FLI1 sous contrôle d'un promoteur CMV.

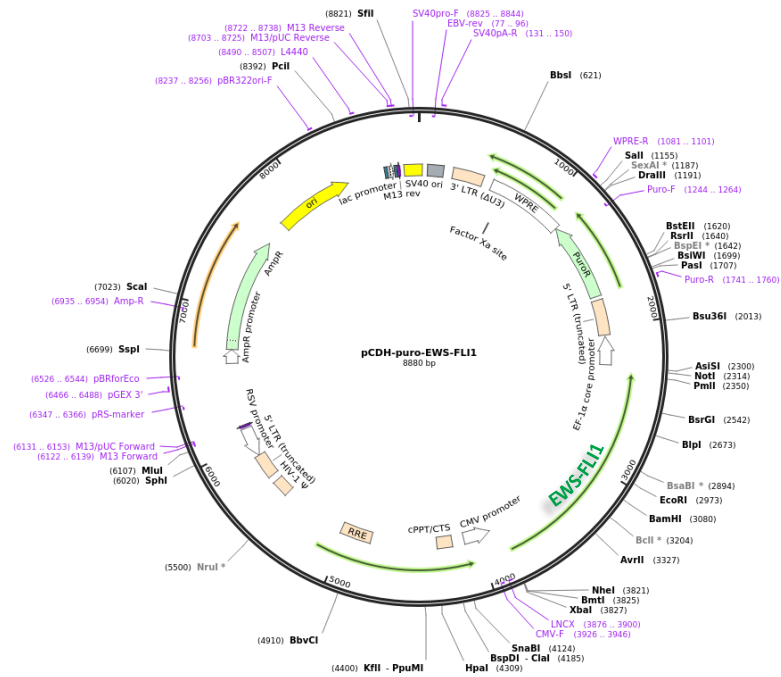


Figure 16 : Vecteur d'expression utilisé pour évaluer l'effet dose réponse transcriptionnelle du promoteur pSK1-Lux. Le vecteur d'expression pCDH-puro-EWS-FLI1 contient la séquence codante d'EWS-FLI1 clonée entre les sites de restriction NheI en 5' et NotI en 3'

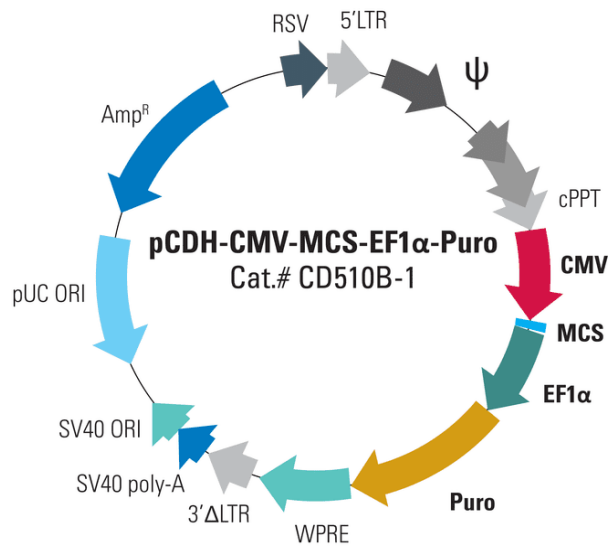


Figure 17 : Vecteur d'expression utilisé pour évaluer l'effet dose réponse transcriptionnelle du promoteur pSK1-Lux. Le vecteur vide pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro contient un MCS (multiple cloning site) sous contrôle d'un promoteur CMV.

### 3.2. Méthodologie

40000 cellules COS-7 sont ensemencées en plaque de 24 puits afin d'obtenir 24h après une confluence comprise entre 50 et 70%. 24h après, les milieux sont renouvelés et la transfection est réalisée en présence de 1,5 $\mu$ L de JetPEI (transfectant) et 100 $\mu$ L de NaCl (150mM) avec :

- ✓ 250ng pSK1-lux (Genecopoeia, ref. HPRM44187),
- ✓ 125ng de plasmide pRLTK-lux codant pour la luciférase Renilla (plasmide de normalisation)
- ✓ 0, 0.5, 1, ou 2 $\mu$ g de plasmide pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (vecteur vide ; Ozyme, CD510B-1) et/ou 0, 0.5, 1, ou 2 $\mu$ g de plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1 (vecteur de surexpression d'EWS-FLI1 ; Addgene, 102813, (Loganathan *et al.*, 2016) pour un total de 2 $\mu$ g de vecteur.

Les milieux sont renouvelés 6h après transfection. 48h après, les surnageants sont collectés et stockés à -20°C et les cellules sont congelées à sec.

L'activité de la luciférase Gaussia est normalisée avec l'activité de la luciférase Renilla pour chaque échantillon. Les résultats de la réponse transcriptionnelle obtenus avec les différentes doses de plasmide de surexpression d'EWS-FLI sont normalisés par rapport à l'activité luciférase du promoteur de la condition transfectée avec les doses identiques de plasmide vide pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro.

## VI- Etude du promoteur de *KCNN1*

### 1. Délétions en 5' du promoteur

#### 1.1. Sous-clonage des différentes constructions du promoteur *KCNN1*

Après avoir dessiné 13 couples d'amorces (logiciel Oligo-7, Tableau 6), et déterminé au préalable la concentration optimale en ions Mg<sup>2+</sup> pour la PCR, celle-ci est réalisé sur 5ng de plasmide pSK1-lux (kit AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity, Thermo Fisher). Les produits de PCR sont ensuite digérés (enzyme de restriction XhoI et HindIII) et purifiés sur colonne (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen). Ils sont ensuite dosés et mis à migrer dans un gel d'agarose à 1,2% afin de vérifier la taille des produits obtenus.

Après avoir préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction, déphosphorylé, et purifié le plasmide pGL3-Basic (Promega, ref E1751), les produits de PCR sont insérés par ligation (T4 DNA Ligase, Thermo Fisher). Des bactéries *E. coli* compétentes (One Shot™ Stbl3™ ChemicalCompetent *E. coli*, Thermo Fisher) sont ensuite transformées (choc thermique) avec 2 $\mu$ L de produit de ligation, et après culture, 200 $\mu$ L de bactéries sont étalées sur gélose contenant 100 $\mu$ g/mL d'ampicilline et mises à pousser à 37°C sur la nuit.

Amorce	Séquence amorce (5' to 3')	Référence	Tm amorce (°C)	Tm calculée (°C)	Enzyme de restriction
-1497	ccgctcgagACCGGCCAGGAGCTCGGT	6596020	65,3	62	XhoI
-1482	ccgctcgagCGGTCCCTGCGGATCATT	6596016	62,2	60	XhoI
-1392	ccgctcgagTAGTTTCGCTGGCCTAGGTG	6596014	62,1	62	XhoI
-1336	ccgctcgagCCGTGTCTTGGAGGCATTTC	6596015	62,1	62	XhoI
-1289	ccgctcgagGCTGTCCCTTTATTGGA	6596017	57,7	52	XhoI
-1230	ccgctcgagTCTCCTCCCATCAGCTAG	6596018	60,7	56	XhoI
-1176	ccgctcgagGAGAGAGGAGAAGATGAA	6596019	57,7	52	XhoI
-1154	ccgctcgagCAAGCAAGTTCACACCAG	6496271	59,2	54	XhoI
-949	ccgctcgagGGGAGAAGCTGGGCGTGT	6496270	63,8	60	XhoI
-689	ccgctcgagAGTGGGGAGGATTTTCGG	6496269	60,7	56	XhoI
-425	ccgctcgagTCTTTTTCCCTCCACAC	6496268	57,7	52	XhoI
-334	ccgctcgagTCCCTCCTCTCAGTATC	6496267	60,7	56	XhoI
-195	ccgctcgagGAATGAATGGAAGAAAAG	6496266	54,6	48	XhoI
+61	ccgaagcttGTCTTGCTGTTCTCCTTC	6496272	56,2	54	HindIII

**Tableau 6 : Table des amorces utilisées pour le sous-clonage des délétions en 5' du promoteur de *KCNM1***

Le lendemain, 10 clones sont sélectionnés et mis en culture. Les plasmides sont ensuite extraits (kit NucleoSpin® PlasmidEasyPure, Macherey-Nagel) et la présence ainsi que la taille des inserts sont vérifiées après coupure enzymatique sur un gel contenant 1% d'agarose.

### 1.2. Dosage de l'activité luciférase

La méthode du dosage de la luciférase permet d'étudier la réponse du promoteur ou partie du promoteur d'un gène d'intérêt. La mesure de l'activité luciférase se fait grâce à un kit « Dual-LuciferaseReporter Assay system » (Promega) en présence d'un premier réactif (LuciferaseAssayReagent II), qui permet l'initiation d'un signal luminescent stable, émis par la luciférase Firefly. Après la mesure de la luminescence, l'addition d'un second réactif (Stop &Glo) stoppe cette réaction et permet la mesure de l'activité luciférase Renilla (normalisation). Ce kit permet la mesure simultanée de l'activité de deux enzymes grâce à un seul système dans un même échantillon.

#### a) Transformation bactérienne

La transformation bactérienne a été réalisée par un choc thermique selon le protocole suivant : à 50µL de bactéries chimiocompétentes *E.coli* OneShot™ Stb13™ (ChemicallyCompetent C7373-03, Invitrogen) ont été ajoutés 10 ng de plasmide SK3-lux (Promogen). Le mélange a été incubé 30 minutes dans la glace, puis placé 45 secondes au bain-marie à 42°C et enfin 5 minutes dans la glace. Un volume de 250 µL de SOC (Invitrogen) a été ajouté dans le tube et le tout a été mis à agiter à 37°C pendant 1 heure. Un aliquot de ce mélange (50 µL) a enfin été étalé sur boîte LB/Agar + ampicilline (100 µg/mL). Après incubation à 37°C pour la nuit, la boîte a été stockée à -4°C, en vue d'effectuer une mini-culture par la suite. Pour cela, une colonie a été inoculée dans 2 mL de LB ampicilline (100 µg/mL) et mise à agiter sur la journée. Une maxi-culture a ensuite été effectuée à partir de 300 µL de

la mini-culture, repris dans 200 mL de LB ampicilline, diluée au 1/1000<sup>ème</sup>. La culture a été mise à agiter sur la nuit à 37°C, afin de réaliser une maxi-prep le lendemain pour extraire et purifier le plasmide.

*b) Amplification des plasmides par maxi-préparation*

L'extraction et la purification du plasmide a été réalisée à partir des protocoles recommandés par Macherey-Nagel®, du kit « Plasmid DNA purification (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi) », section Maxi, High-copy. Les bactéries ont dans un premier temps été lysées à l'aide de deux tampons RES et LYS. Par la suite, les débris cellulaires ont été éliminés à l'aide du 1<sup>er</sup> filtre d'une colonne, tandis que l'ADN est retenu sur une résine de silice. Après plusieurs lavages, l'ADN plasmidique a été élué, avant d'être précipité avec de l'isopropanol, lavé à l'éthanol 70% et reconcentré avec du tampon TE. Enfin, l'ADN plasmidique a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo Fischer).

*c) Vérification des constructions : digestion enzymatique et séquençage*

Afin de vérifier la présence de l'insert d'intérêt dans le plasmide, une digestion enzymatique a été réalisée. Pour cela, 1 µg de plasmide a été mélangé avec les enzymes de restriction XhoI et HindIII (New England Biolabs) (1U) ainsi qu'avec du tampon Cut Smart 10X (1X final), en ajustant le volume final à 50 µL. Une migration sur gel d'agarose à 1,2% a été réalisée par la suite, à 100 V en courant continu, dans le but de vérifier cette digestion.

Pour chaque construction, 20µL à 100ng/µL de plasmide sont envoyés pour séquençage près de la société Eurofins. Les amorces utilisées sont le couple « pGL rev et pGL3 for ». La vérification et l'alignement de la séquence fournie au format .ab1 avec la séquence connue du promoteur, est ensuite réalisée à l'aide du logiciel Word, et des sites internet suivant :

- Reverse complement : [https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
- Clustal omega : <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

*d) Ensemencement et transfection*

40000 cellules COS-7 sont ensemencées en plaque de 24 puits afin d'obtenir 24h après une confluence comprise entre 50 et 70%. 24h après, les milieux sont renouvelés et la transfection est réalisée en présence de 1,5µL de JetPEI (transfectant) et 100µL de NaCl (150mM) avec :

- ✓ 250ng des différentes délétions en 5' du promoteur dont celles-ci sont situées en amont de la région codant la luciférase Firefly,
- ✓ 125ng de plasmide pRLTK-lux codant pour la luciférase Renilla (plasmide de normalisation)

- ✓ 1µg de plasmide pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (vecteur vide ; Ozyme, CD510B-1) ou 1µg de plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1 (vecteur de surexpression d'EWS-FLI1 ; Addgene, cat nb.102813, (Loganathan *et al.*, 2016).

Les milieux sont renouvelés 6h après transfection. 48h après transfection, les plaques sont lavées au PBS et congelées à sec.

e) Lecture luciférase

100 µL de tampon de lyse 1X (Passive Lysis Buffer, Promega) ont été ajoutés sur les cellules congelées à sec, l'ensemble étant ensuite mis à agiter durant 15 minutes. Les mesures de luciférase ont été effectuées à partir de 20 µL de lysat, déposés sur une plaque 96 puits à fond blanc, à l'aide d'un luminomètre à plaque et à injecteurs (Tri Star LB941 ; Berthold Technologies) à l'aide de 2 réactifs permettant la lecture respectivement de l'activité de la luciférase Firefly (réactif LuciferaseAssay) et de l'activité de la luciférase Renilla (réactif Stop&Glo). L'acquisition des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel MicroWin 2000.

**2. Analyse du promoteur de SK1 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**

Le kit ChIP-IT® Express (Active Motif®, cat no. 53008) a été employé pour nos expériences de ChIP. La réaction d'immuno-précipitation de la chromatine se passe selon les 4 étapes décrites ci-dessous.

**2.1. Obtention de la chromatine**

Les cellules A673 et TC71 ont étéensemencées en boîte de 15cm. Lorsque les cellules atteignent 70 à 80% de confluence, les milieux sont aspirés et la fixation est effectuée à l'aide d'une solution contenant 1% de formaldéhyde (Formaldéhyde 37%, Sigma) en milieu sans SVF ni antibiotique (respectivement DMEM pour A673 et RPMI pour TC71) pendant 9min à température ambiante sous agitation lente.

Les tapis cellulaires sont ensuite lavés brièvement au PBS 1X froid, puis l'action du formaldéhyde est inhibée par incubation avec une solution de glycine tamponnée (PBS 1X, Glycine 1X) pendant 5min, à température ambiante sous agitation lente.

Les cellules sont ensuite lavées brièvement au PBS 1X froid 5 min à température ambiante. Le tapis cellulaire est décollé avec du PBS 1X sur glace, et récupéré dans du PBS 1X contenant un inhibiteur de protéases (PMSF)

Après centrifugation 10min à 2500rpm à 4°C, les cellules sont reprises dans un tampon de lyse contenant les inhibiteurs de protéases et incubées sur glace après homogénéisation pendant 30min.

Après une nouvelle étape de centrifugation à 4°C de 10min à 5000rpm, le lysat cellulaire est repris dans 300µL de tampon de sonication (avec PIC (Protease Inhibitor Cocktail) et PMSF

(PhenylMethylSulfonyl Fluoride) et la chromatine est soniquée 35, 40, ou 45 cycles à forte intensité de 30sec ON / 30sec OFF à 4°C sur glace dans un sonicateurBiorupteur (Diagenode).

Pour finir, la chromatine est centrifugée 10min à 15000rpm à 4°C et le surnageant collecté dans un tube de 1,5mL en gardant un aliquot de 50µL pour la vérification de l'efficacité de la sonication

### 2.2. *Vérification de l'efficacité de la sonication*

150µL d'eau RNase free et 10µL de NaCl 5M sont ajoutés à 50µL de chromatine réchauffée sur glace, et incubés sur la nuit à 65°C dans un bain marie.

Les échantillons sont ensuite digérés 15min à 37°C avec la RNase A (1µg/µL) puis 90min à 42°C à la protéinase K (1µg/µL). L'ADN est alors purifié par colonne à l'aide du kit Chromatin IP DNA Purification Kit (Active Motif, cat no. 58002) selon les recommandations du fabricant.

Après purification l'ADN fragmenté est élué dans 50µL de tampon puis dosé au Nanodrop et séparé sur gel d'agarose à 1,2%.

Si la taille des ADN soniqués est encore trop grande, quelques cycles supplémentaires de sonication sont effectués afin d'obtenir des fragments d'une taille moyenne d'environ 400 bp.

### 2.3. *Immunoprécipitation de la chromatine*

15µg de chromatine sont incubés avec 3µg d'anticorps rabbit anti-FLI1 (Abcam, ab15289) ou rabbitanti-IgG (isotype contrôle, Abcam, ab171870) en tampon CHIP Buffer 1 et 25µL de billes magnétiques couplées à la protéine G sous agitation solaire la nuit à 4°C.

Le lendemain, les billes sont lavées soigneusement 3 fois en tampon CHIP Buffer 1, puis 2 fois en CHIP Buffer 2. L'élution est ensuite réalisée à température ambiante sous agitation solaire pendant 15min par resuspension des billes dans 50 µL d'*Elution Buffer* AM2. On Ajoute ensuite 50 µL du *Reverse Cross-linking Buffer* sur la chromatine éluée et on mélange en pipetant. Après avoir mis les tubes sur le portoir magnétique pour culoter les billes, le surnageant est transféré dans un autre tube.

88 µL de *CHIP Buffer 2* et 2 µL de NaCl 5M sont ajoutés aux 10 µL du tube « Input ». Les tubes « CHIP » et « Input » sont incubés à 95°C pendant 15 min dans un thermocycleur.

Les tubes sont ensuite remis à température ambiante, et après une brève centrifugation 2 µL de *Proteinase K* à 1µg/µL sont ajoutés et les tubes sont incubés 1h à 37°C. L'action de la protéinase K est enfin inactivée par l'ajout de 2 µL de *Proteinase K Stop Solution*.

La réaction de PCR peut ensuite être réalisée directement sur chacun des tubes préparés

### 2.4. *Analyse par PCR semi-quantitative*

#### a) *Optimisation des couples d'amorces de PCR semi quantitative*

La validation des couples d'oligonucléotides (Tableau 7)utilisés pour la réaction de CHIP a été réalisée sur 100ng d'ADNg extraits de la lignée SKES-1.

Pour ce faire nous avons utilisé le kit AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity (Thermo Fisher) en utilisant le tampon 2 qui est adapté aux réactions de PCR sur de l'ADN génomique.

Le mix utilisé comporte par réaction de PCR pour 50µL final :

- ✓ 5µL de 10X AccuPrime™ PCR Buffer II
- ✓ 1µL de dNTP 10mM (kit Thermo scientific K1652)
- ✓ 0,4µL de MgSO4 50mM
- ✓ 100ng d'ADN génomique
- ✓ 0,4µL d'AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, High Fidelity
- ✓ 2µL de couple de primersQr+Qf à 5µM

Produits de PCR	Primer	Séquence
1	hSK1-ChIP- Qf1	TCCCTGCGGATCATTTTCCC
	hSK1-ChIP- Qr3	CCTTCCCTGGCTCTCCTCA
2	hSK1-ChIP- Qf3	GCAAGCAAGTTCACACCAGG
	hSK1-ChIP- Qr5	CCCAGTGGAGCCCGAAAAT
3	hSK1-ChIP- Qf5	GCCTGTGAGGAGTCAGGGT
	hSK1-ChIP- Qr7	TTGTGTGTGAGATGCGCTCAG
4	hSK1-ChIP- Qf6	GAGGATTTTCGGGCTCCACTG
	hSK1-ChIP- Qr9	CACCCACCTTCAGCCTTGG
5	hSK1-ChIP- Qf7	TCTGACTAAAGCATGGGTCCG
	hSK1-ChIP- Qr9	CACCCACCTTCAGCCTTGG
6	hSK1-ChIP- Qf9	GGGGGAGGGCTATTTTLAGAATGA
	hSK1-ChIP- Qr10	AGGGCCCGCGGATATGTCTTG

Tableau 7 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR semi quantitative du protocole de ChIP

Après la réaction de PCR, les mélanges réactionnels sont mis à migrés sur un gel d'agarose à 1,2%.

*b) PCR semi quantitative sur l'ADN soniqué et immunoprécipité.*

Pour ce faire nous avons utilisé comme précédemment le kit AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity (Thermo Fisher).

Le mix utilisé comporte par réaction de PCR pour 25µL final :

- ✓ 2,5µL de 10X AccuPrime™ PCR Buffer II
- ✓ 0,5µL de dNTP 10mM (kit Thermo scientific K1652)
- ✓ 0,2µL de MgSO4 50mM
- ✓ 5µL d'ADN soniqué et ou immuno-précipité (Input, IP FLI, Isotype Ct)
- ✓ 0,2µL d'AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, High Fidelity
- ✓ 2µL de couple de primersQr+Qf à 5µM

Après la réaction de PCR, 5µL de tampon de charge sont déposés dans les différents mélanges réactionnels, et ceux-ci sont mis à migrer sur un gel d'agarose à 1,2% en prenant soin de déposer successivement la condition Input DNA / IP FLI1 / Isotype Ct.



### 3. Caractérisation de l'élément de réponse à EWS-FLI1 du promoteur de *KCNN1* par expérience de gel retard EMSA : mise au point des conditions expérimentales

Afin de déterminer les conditions expérimentales pour mettre en évidence les interactions entre EWS-FLI1 et la séquence de le promoteur de *KCNN1*, nous nous sommes basés sur les travaux publiés par les équipes de Vittorio Caropreso et Olivier Delattre (Caropreso *et al.*, 2016; Guillon *et al.*, 2009).

Pour cela nous avons sélectionné la séquence proposée dans leur expérience de gel retard (5'-CCTGAAACAGGAAGTCAGTCAG-3') et nous l'avons fait synthétiser par la société IDT Technologies sous la forme de sonde double brin (duplex) couplée avec un fluorochrome 800CW en 5' de chaque brin.

L'optimisation a ensuite été réalisée à la fois sur des extraits nucléaires de la lignée A673, mais également à l'aide de protéines recombinantes obtenues à partir de sous-clonage de la séquence codante d'EWS-FLI1 dans un plasmide FLAG-HA-pcDNA3.1.

#### 3.1. *Extraction des protéines nucléaires des lignées ASP14 et A673*

Les lignées ASP14 et A673 ont été ensemencées en boîte de 10cm. Le lendemain les milieux sont renouvelés et pour la lignée ASP14, les cellules sont traitées ou non avec 1µg/mL de doxycycline. Au bout de 4 jours, les protéines sont extraites à l'aide du kit NE-PER (Thermofisher Scientific, cat no. 78835).

#### 3.2. *Sous-clonage du gène d'expression d'EWS-FLI1*

##### a) *Plasmides utilisés*

Le sous clonage de la séquence codante d'EWS-FLI1 présente dans le plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1 (Figure 18 A) a été réalisé afin d'étudier la réponse transcriptionnelle du promoteur de *KCNN1* (pSK1-Lux) nous avons réalisé une gamme de plasmide de surexpression d'EWS-FLI1 et de vecteur vide correspondant au plasmide dans lequel a été cloné la séquence codante de la protéine de fusion EWS-FLI1 sous contrôle d'un promoteur CMV (Figure 18 B).



### b) Méthodologie

Quatre fois 5µg de plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1 sont digérés à l'aide des enzymes NotI et XbaI (New England Biolabs) (1U) dans un mix contenant 5µL de tampon CutSmart10X (1X final) pour un volume final de 50µL. Après incubation d'une heure à 37°C, les mélanges obtenus sont rassemblés et déposés dans un puits d'un gel d'agarose à 1% en T.A.E. X contenant du BET, et mis à migrer à 100 V en courant continu. La bande correspondant à l'insert est ainsi isolée sous rayonnement UV et purifiée à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, ref 28704). Après extraction, l'insert est dosé au Nanodrop.

5µg de plasmide FLAG-HA-pcDNA3.1 (Addgene, cat nb.52535, (Horn *et al.*, 2014)) sont digérés à l'aide des enzymes NotI et XbaI (New England Biolabs) (1U) dans un mix contenant 5µL de tampon CutSmart10X (1X final) pour un volume final de 50µL. Après incubation d'une heure à 37°C, le plasmide linéarisé est déphosphorylé, puis purifié à l'aide du kit QIAquick PCR purification Kit (Quiagen, ref 28104). Après extraction, l'insert est dosé au Nanodrop.

La séquence codante d'EWS-FLI1 purifiée est insérée par ligation (T4 DNA Ligase, Thermo Fisher). Des bactéries *E. coli* compétentes (*One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli*, Thermo Fisher) sont ensuite transformées (choc thermique) avec 2µL de produit de ligation, et après culture 200µL de bactéries sont étalées sur gélose contenant 100µg/mL d'ampicilline et mises à pousser à 37°C sur la nuit. Six clones sont sélectionnés et mis en culture. Les plasmides sont ensuite extraits (kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure, Macherey-Nagel) et vérifiés après coupure enzymatique sur un gel contenant 1% d'agarose.

### 3.3. *Production de la protéine recombinante EWS-FLI1 taguée Flag et HA*

La production de protéine recombinante est réalisée à l'aide du kit TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, L1170) permettant à l'aide d'un système acellulaire de proposer un système couplé de transcription/traduction nécessaire à la synthèse protéique.

Sur glace, 1µg de plasmide FLAG-HA-EWS-FLI1-pcDNA3.1 est ajouté dans 40µL de TNT® Master Mix contenant de la méthionine (20mM final) complété avec de l'eau exempte de nucléase pour un volume final de 50µL. L'incubation est réalisée pendant 80min à 37°C.

Une fois la production de protéine recombinante réalisée, le mélange réactionnel est stocké à -20°C jusqu'aux manipulations suivantes (délai maximum de 2 semaines).

### 3.4. *Expérience de gel retard ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Pour la réaction de formation d'un complexe protéine-sonde, 1µg d'extrait protéique nucléaire de la lignée A673, ou 1µL du mix réactionnel pour l'obtention de la protéine recombinante, sont incubés avec 1,5µL de sonde double brin marquée 800CW (sonde fluorescente) en 5' à 0,2µM dans un mix contenant pour un volume final de 30µL :

- ✓ 3µL de tampon de fixation (100mM Tris, 50mM KCl, 10mM DTT pH 7,5)

- ✓ 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> 100mM,
- ✓ 1,5µL de Poly (dI•dC) à 1µg/µL
- ✓ 3µL de DTT 25mM / 2,5% Tween® 20

Pour les réactions de compétition utilisant des excès de sonde non-marquée 800CW différentes quantités de sonde sont ajoutées pour un volume final de 30µL en utilisant des dilutions intermédiaires plus concentrées.

Enfin pour la réaction de complexation anticorps-protéine-sonde, 1µg d'anticorps (anti-FLI1, anti-FLAG, ou anti-HA) est ajouté au mix réactionnel.

Les mix sont homogénéisés soigneusement à la pipette et sont mis à incuber 30min à température ambiante dans l'obscurité.

Les mix sont ensuite déposés après ajout de tampon de charge (10X orange loading dye) dans un gel contenant 5% d'acrylamide et 2,5% de glycérol en tampon TBE 0,5X (Tris Borate EDTA) et mis à migrer en tampon TBE 0,5X à 10V/cm.

Quand la migration est terminée, le gel est transféré sur papier Whatman et l'acquisition est faite à 800nm à l'aide de l'appareil Odyssey FC de chez Li-Cor. L'acquisition des images a été réalisée avec le logiciel Image Studio, et le traitement par Image J et par Image Studio.

### VII- Extinction de *KCNN1* par transduction de cellules avec un shRNA

20.10<sup>3</sup> cellules sontensemencées en plaque de 24 puits à raison de 2 puits par condition. Trois shRNA sont testés pour SK1 et un shCt sert de contrôle. Les cellules ainsi transduites sont amplifiées avant d'être sélectionnées avec de la puromycine (les particules lentivirales produites possèdent un gène de résistance à cet antibiotique).

Après 2 passages, les cellules ainsi sélectionnées sont vérifiées par RT-PCR et en western blot afin d'évaluer le taux et la spécificité d'extinction du canal SK1.

### VIII- Test de prolifération

Les cellules (2000 à 5000 cellules selon le type cellulaire) sontensemencées en sixplicat dans des plaques de 96 puits. Les cellules sont ensuite fixées à la glutaraldéhyde à 1%, et colorées au Crystal violet. Après séchage, le précipité est resuspendu en tampon de Sorenson et la lecture de la densité optique est effectuée à 570nm (Victor, PerkinElmer).

### IX- Test de clonogénicité

Cinq cents cellules sontensemencées en triplicat en plaque de 6 puits. Au terme désiré, les cellules sont alors fixées à la glutaraldéhyde à 1%, et colorées au Crystal violet. Après séchage, l'acquisition est réalisée à l'aide d'un scanner à plat et les clones formés sont dénombrés.

## X- Expérimentation *in vivo* et histologie des tumeurs

### 1.1. *Expérimentation in vivo*

2M de cellules TC71 modifiées avec un shLacZ, et 2M de cellules TC71 modifiées avec un shSK1 sont injectées, après avivement du périoste, en para-tibial dans des souris NMRI-Nude (Janvier LABS).

La croissance tumorale est évaluée 2 fois par semaine, et lorsque la tumeur devient palpable, le volume tumoral est mesuré. Lorsque le volume éthique de 2000mm<sup>3</sup> est atteint pour les premières souris du groupe contrôle, les souris sont sacrifiées.

### 1.2. *Histologie et immunohistochimie*

Les tumeurs collectées sont fixées 48h en formol 4% puis incluses en paraffine. Quatre coupes sériées de 2µm sont réalisées sur 2 niveaux de coupes afin de procéder aux différentes techniques.

La première lame est colorée au HE afin d'évaluer l'architecture globale de la tumeur et la présence de plage de nécrose ou non. Les lames suivantes sont immunomarquées afin d'évaluer l'apoptose (caspase 3 clivée, CellSignaling Technologies), la vascularisation (CD146, Abcam) et la prolifération cellulaire (antigène Ki67, Dako).

Après déparaffinage, les coupes sont réhydratées et le démasquage antigénique est réalisé à chaud (Tampon citrate pH6 ou Tampon Tris/EDTA pH9). L'activité des peroxydases endogènes est inhibée par incubation avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (Gifère) et les sites de fixation non-spécifiques sont saturés avec une solution contenant 2% de sérum de chèvre non-immun, 1% de BSA, dilué en TBS tween 0,05% pH 7,4. L'anticorps primaire, dilué en solution de saturation, est incubé 1h à température ambiante et les complexes immuns sont détectés à l'aide d'un système ABC (anticorps secondaire biotynilé et streptavidine-Peroxydase). La révélation est réalisée avec la DAB (3, 3'-diaminobenzidine).

Les lames sont enfin contre-colorées à l'hématoxyline de Gill-2, déshydratées, éclaircies et montées entre lames et lamelles au Pertex.

L'acquisition des colorations et immunomarquages est réalisée à l'aide d'un scanner de lames (Nanozoomer, Hamamatsu).

# **RESULTATS**

## I- *KCNN1*, gène codant le canal SK1, est exprimé dans les lignées de sarcome d'Ewing et constitue une signature des sarcomes d'Ewing

### 1. Expression des gènes codants les canaux SKCa dans des lignées d'ostéosarcome, de sarcome d'Ewing, et des cellules souches mésenchymateuses

Dans un premier temps, nous avons comparé le niveau d'expression des gènes *KCNN1*, *KCNN2*, et *KCNN3*, codant respectivement les canaux SK1, SK2 et SK3, par RT-qPCR dans 7 lignées d'ostéosarcomes et 7 lignées de sarcomes d'Ewing (Figure 19A, B, et C). Les résultats sont normalisés avec les résultats obtenus pour une lignée d'ostéosarcome, la lignée HOS.

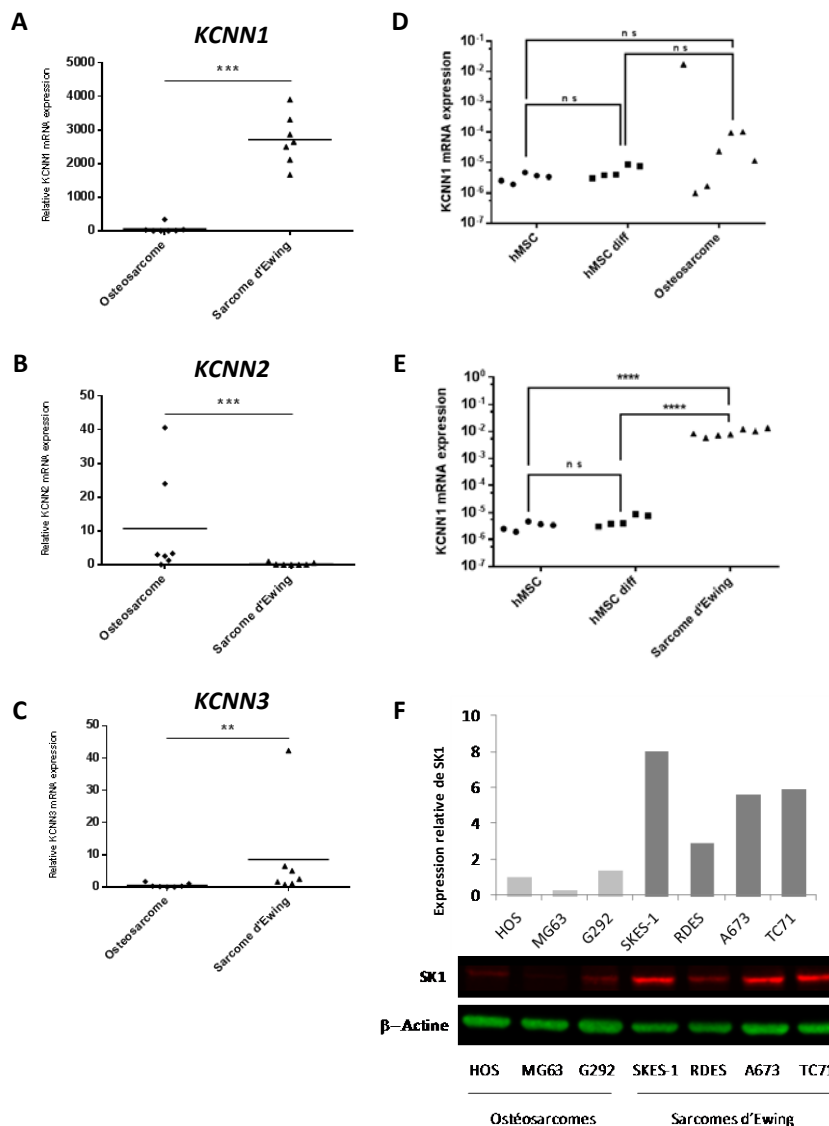


Figure 19 : Evaluation des niveaux d'expression de *KCNN1*, *KCNN2* et *KCNN3* dans des lignées d'ostéosarcome, de sarcome d'Ewing et des cellules souches mésenchymateuses différenciées ou non en ostéoblastes. A, B) Expression relative (exprimée en  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) de *KCNN1* (A), de *KCNN2* (B), et *KCNN3* (C) dans 7lignées d'ostéosarcomes et 7 lignées de sarcome d'Ewing. (\*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ , Test de Mann-Whitney). D, E) Expression de *KCNN1*(exprimé en  $2^{-\Delta CT}$ ) dans des cellules souches mésenchymateuses, provenant de 5 donneurs sains, différenciées (hMSCdiff) ou non (hMSC) en ostéoblastes et 7 lignées d'ostéosarcomes (D) ou 7 lignées de sarcome d'Ewing(E). (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Test de Tukey). F) Evaluation du niveau protéique de SK1 dans 4 lignées de sarcome d'Ewing et 3 lignées d'ostéosarcome.

Concernant *KCNN1*, la figure 19A montre un taux d'expression de l'ARNm de *KCNN1* beaucoup plus important dans les lignées de sarcome d'Ewing que dans les lignées d'ostéosarcome. Les expériences de Western-Blot à partir de 3 lignées d'ostéosarcome (HOS, MG63 et G292) et 4 lignées de sarcome d'Ewing (SKES-1, RDES, A673 et TC71) confirment ces résultats au niveau protéique (Figure 19 F).

Concernant *KCNN2* (figure 19 B), nos expériences de RT-qPCR permettent de détecter une expression de l'ARNm de *KCNN2* dans les lignées cellulaires testées et de façon plus importante dans deux lignées d'ostéosarcome sur sept. Néanmoins, il convient de mesurer la significativité de ces résultats, car les Ct enregistrés pour ces échantillons sont de l'ordre de 30 cycles.

Concernant *KCNN3*, la figure 19C montre un taux d'expression de l'ARNm de *KCNN3* plus important dans les lignées de sarcome d'Ewing (plus particulièrement dans la lignée EW24), que dans les lignées d'ostéosarcome.

Dans un second temps, nous avons comparé le niveau d'expression de *KCNN1* dans des cellules saines (cellules souches mésenchymateuses issus de 5 donneurs sains, différenciées *in vitro* ou non en ostéoblastes) et 7 lignées d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing. Les résultats de RT-qPCR montrent un niveau d'expression faible et pas de différence significative d'expression de *KCNN1* entre les cellules souches mésenchymateuses différenciées ou non en ostéoblastes et entre cellules saines et lignées d'ostéosarcome (figure 19D). En revanche, une augmentation de l'expression de *KCNN1* est observée entre les cellules saines et les lignées de sarcome d'Ewing (figure 19E).

## 2. Expression des gènes codants les canaux calciques associés ORAI dans les lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing

Par la suite, nous avons comparé le niveau d'expression des gènes codant les canaux calciques associés aux canaux SKCa, ORAI1, ORAI2 et ORAI3 dans 7 lignées d'ostéosarcome et 7 lignées de sarcome d'Ewing.

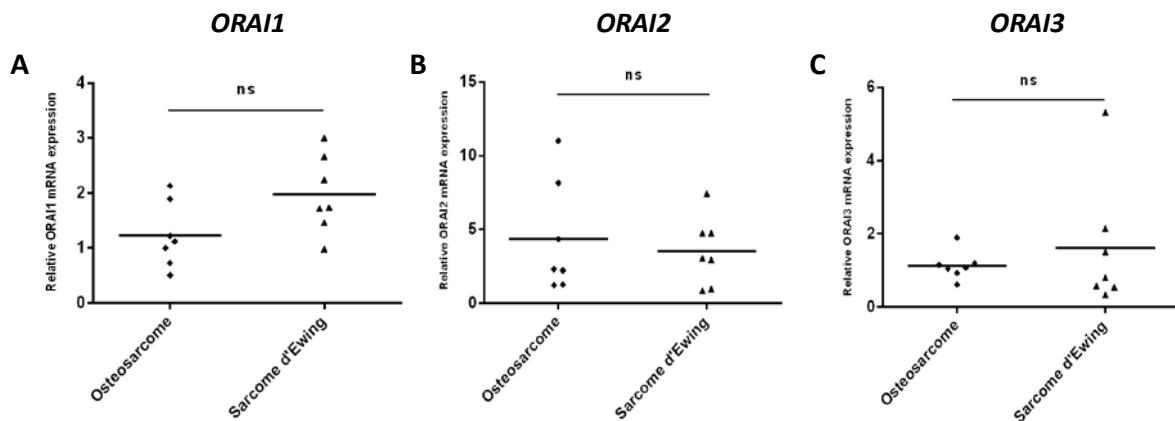


Figure 20 : Evaluation des niveaux d'expression des canaux calciques associés ORAI1, ORAI2, et ORAI3 dans des lignées d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing. Expression relative (exprimé en  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) des canaux ORAI1 (A), ORAI2 (B), et ORAI3 (C) dans 7 lignées d'ostéosarcomes et 7 lignées de sarcome d'Ewing. (Test de Mann-Whitney).



Les résultats de RT-qPCR ne montrent pas de différence significative d'expression d'*ORAI1*, *ORAI2* et *ORAI3* entre les lignées d'ostéosarcome et les lignées de sarcome d'Ewing (figures 20A à C).

### 3. Expression de *KCNN1* dans des tumeurs de patients atteints de différents cancers

Nous nous sommes ensuite intéressés à évaluer, à l'aide de bases de données publiques de RNAseq (R2:GenomicsAnalysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)), l'expression de *KCNN1* dans différents types de tumeurs (Figure 21). Nous observons ainsi une expression de *KCNN1* dans les tumeurs d'Ewing plus importantes que pour tous les autres types de tumeurs testés qu'il s'agisse de carcinomes mais aussi et surtout de sarcomes.

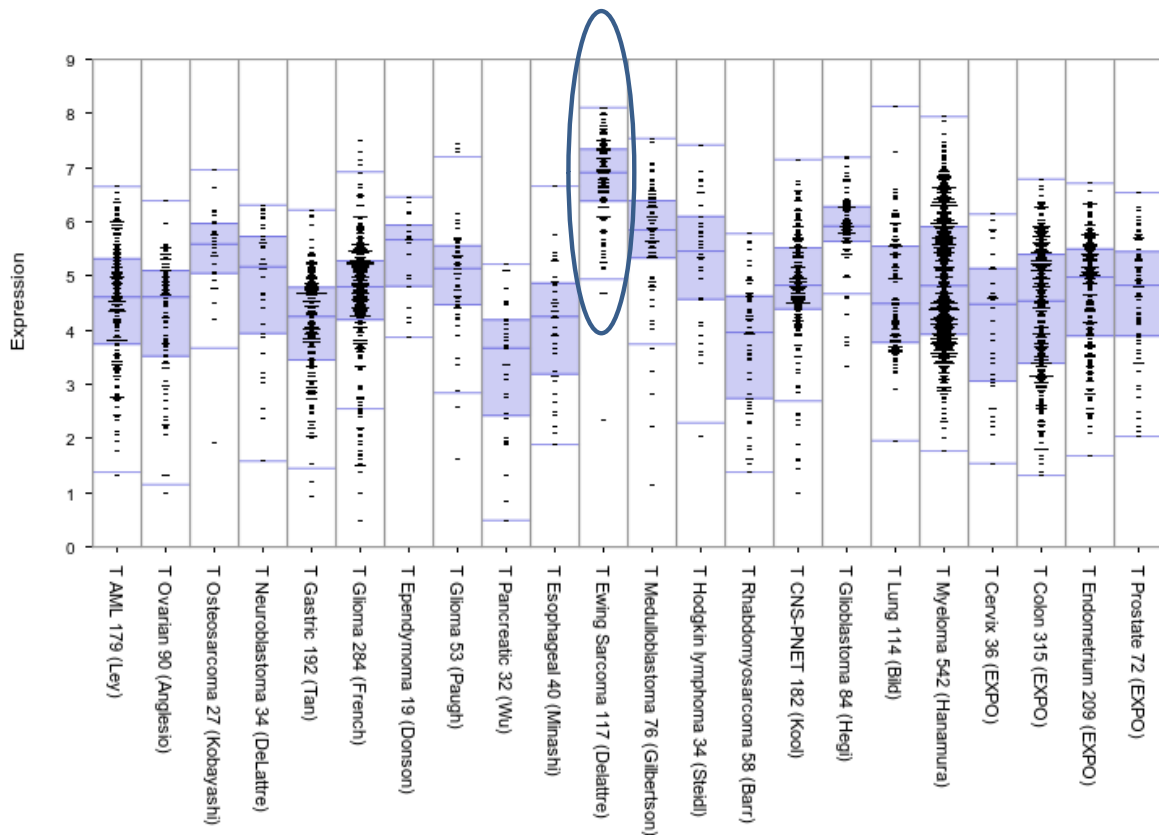


Figure 21 : Evaluation de l'expression de *KCNN1* dans des tumeurs de sarcome d'Ewing. L'expression (exprimée en base de log2) de *KCNN1* a été évaluée dans différentes tumeurs en choisissant la même base de normalisation (MAS5.0) pour chaque jeu de données des différentes tumeurs.

Ce résultat renforce l'ensemble des analyses réalisées sur l'expression de *KCNN1* dans nos lignées de sarcomes d'Ewing et soutient l'hypothèse que *KCNN1* pourrait constituer une signature pour cette tumeur.

A l'aide de ces bases de données publiques nous avons également évalué la corrélation existant entre le taux de survie à 5 ans et l'expression de *KCNN1* dans une cohorte de patients atteints de sarcome d'Ewing (Volchenboum *et al.*, 2015) (Figure 22)

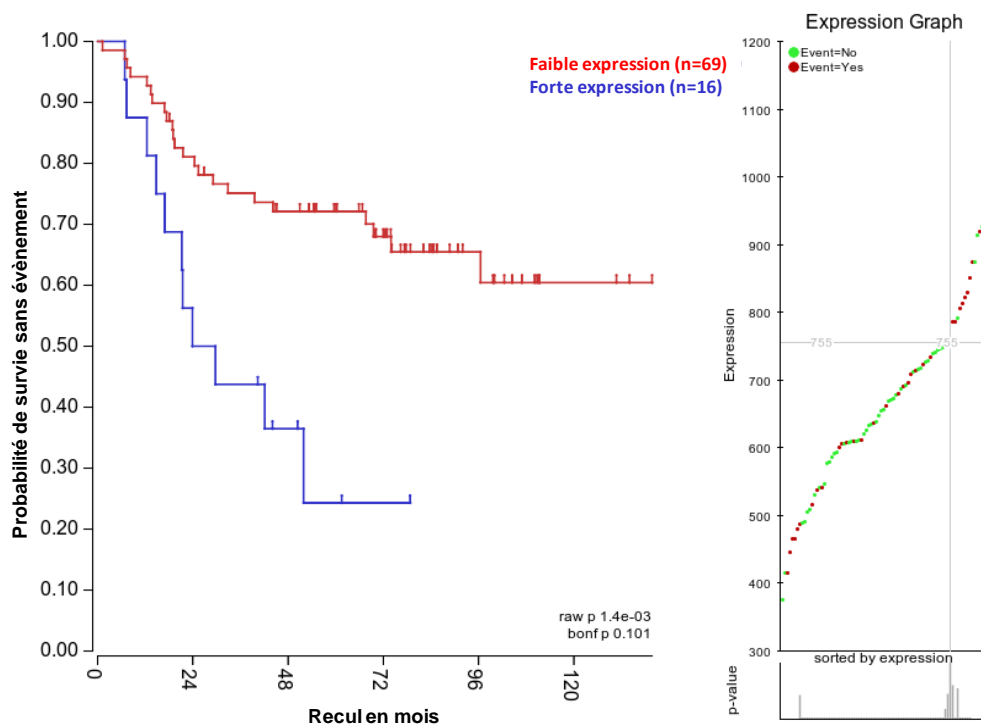


Figure 22 : Représentation du taux de survie à 5 ans de patients atteints de sarcome d’Ewing selon l’expression relative de *KCNN1*. Courbe de Kaplan-Meier établie selon les résultats de RNAseq de la base de données de Dirksen (Core Exon) comportant 85 patients disponible sur la plateforme R2:GenomicsAnalysis and Visualization Platform

La courbe de Kaplan-Meier a été établie en regroupant les échantillons selon les valeurs d’expression de *KCNN1* (obtenue par puce à ARN, ou microarray) avec un « cut-off » d’expression de 755,3 obtenu par un algorithme appelé scan du site R2

La courbe réalisée montre qu’il semble exister une relation entre le taux de survie à 5 ans des patients et le niveau d’expression du gène *KCNN1* ( $p=1.10^{-3}$ ,  $p$  ajustée par Bonferroni=0.101). En effet on constate qu’une forte expression de *KCNN1* est associée à une probabilité de survie sans évènement, ce qui renforce l’idée que *KCNN1* constitue à la fois une signature des sarcomes d’Ewing mais qu’il est également un marqueur de l’évolution de la pathologie.

## II- EWS-FLI1 régule l’expression de SK1

### 1. L’extinction d’EWS-FLI1 réprime l’expression de *KCNN1*

Comme 85% des sarcomes d’Ewing, les 7 lignées de sarcomes d’Ewing utilisées dans cette étude sont caractérisées par la translocation chromosomique EWS-FLI1. Nous avons donc étudié l’implication potentielle d’EWS-FLI1 dans la régulation de l’expression de *KCNN1*. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée de sarcome d’Ewing A673 transfectée stablement avec un shRNA dirigé contre EWS-FLI1 inductible par la doxycycline (lignée ASP14).

Comme le montre la figure 20, on observe une diminution de l'expression d'*EWS-FLI1* dès 4h de traitement des cellules à la doxycycline (Figure 23A), ainsi qu'une diminution de l'expression de *KCNN1* après 14h de traitement des cellules (Figure 23B).

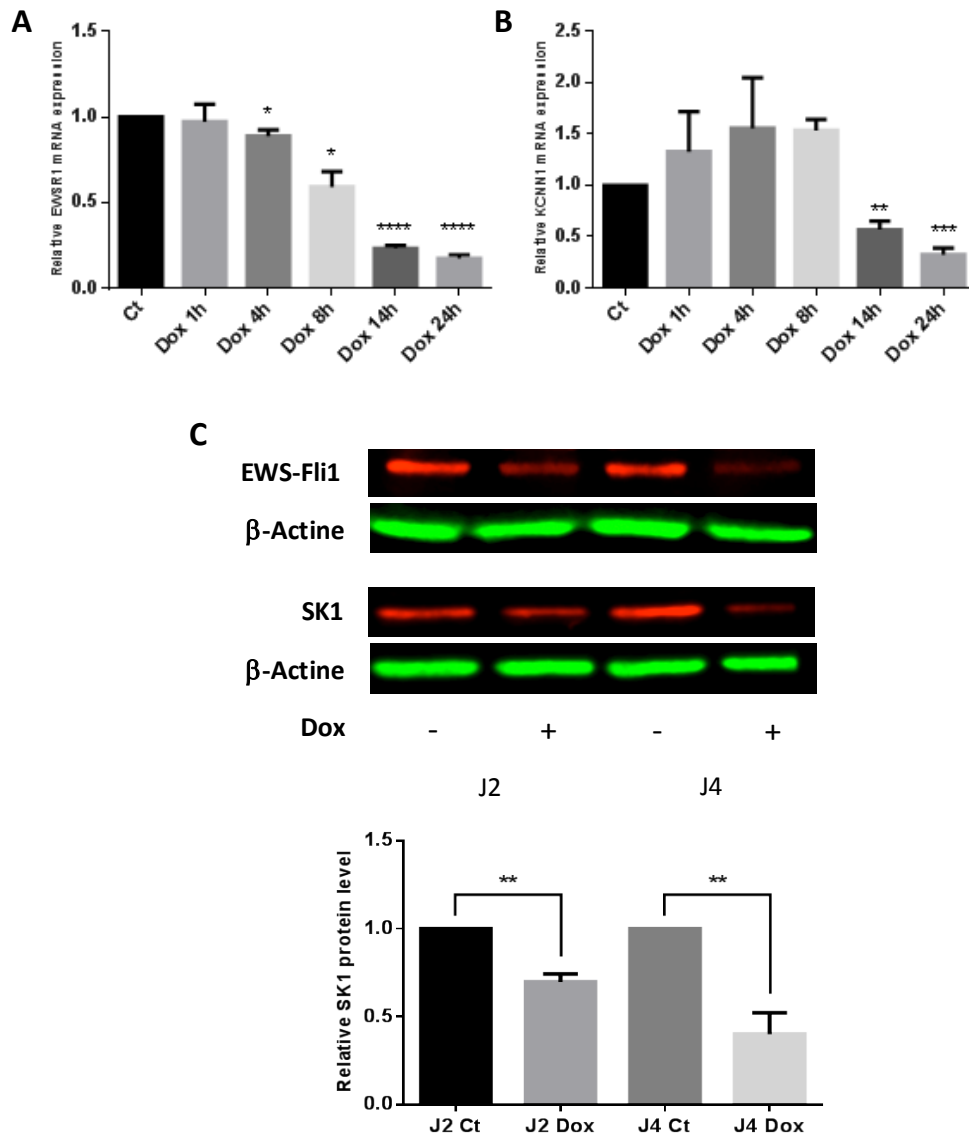


Figure 23 : L'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de *KCNN1* et la production de SK1. A, et B) Expression relative (exprimée en  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) des gènes *EWS-FLI1* (A) et *KCNN1*(B) dans la lignée ASP14 traitée à la doxycycline au cours du temps. C) Expression des protéines SK1 et EWS-FLI1 après 2 et 4 jours de traitement des cellules à la doxycycline. \*  $p<0.05$  ; \*\*  $p<0.01$  ; \*\*\*  $p<0.001$  ; \*\*\*\*  $p<0.0001$  , Test de Student, n=3

Ces résultats sont confirmés au niveau protéique (Figure 23C).En effet, une diminution de l'expression des protéines SK1 et EWS-FLI1 est détectable après 2 jours de traitement des cellules à la doxycycline.

Afin de confirmer les résultats obtenus par RT-qPCR sur la lignée ASP14, nous avons étudié l'influence de l'extinction d'EWS-FLI1 par une technique de transfection transitoire à l'aide d'un mélange de siRNA dirigé contre *EWS-FLI1* sur d'autres lignées de sarcomes d'Ewing (A673, RDES, SKES-1, et TC71).Les résultats obtenus par RT-qPCR montrent une extinction d'EWS-FLI1 pour les

4 lignées après 48h de transfection, associée de façon plus ou moins importante selon les lignées à une diminution de l'expression relative de *KCNN1* (Figures 24 A à H).

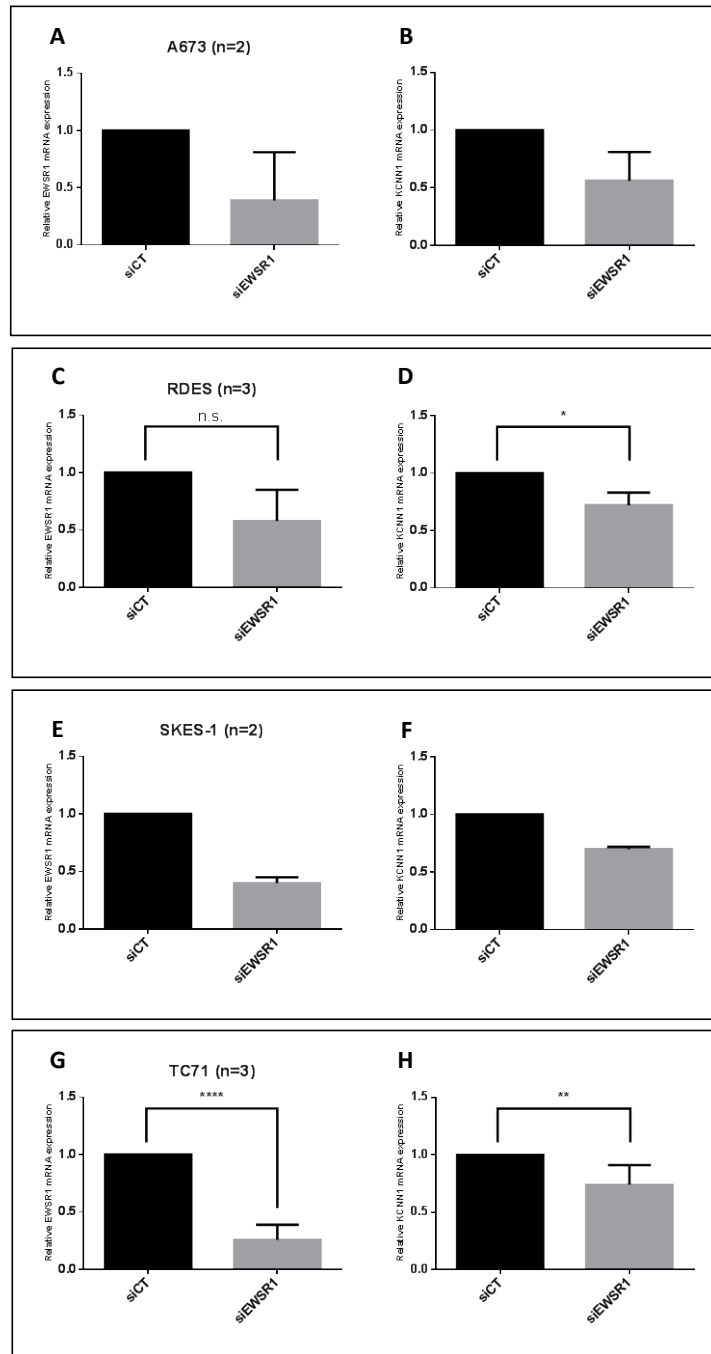


Figure 24 : L'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de *KCNN1* dans différentes lignées de sarcome d'Ewing. A à H) Expression relative (exprimée en  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) des gènes *EWS-FLI1* (A, C, E, et G) et *KCNN1*(B, D, F, et H) dans les lignées A673 (A et B), RDES (C et D), SKES-1 (E et F), et TC71 (G et H) transfectées transitoirement avec un mélange de siRNA dirigé contre EWS-FLI1. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  , Test de Student, n=3 pour RDES et TC71 et n=2 pour A673 et SKES-1

L'utilisation d'ARN interférent dirigés contre *EWS-FLI1* montrent que l'extinction d'EWS-FLI1 réprime l'expression de *KCNN1* dans les lignées A673, RDES et TC71, et suggèrent un effet comparable pour la lignée SKES-1.

L'ensemble des résultats obtenus tendent à indiquer qu'EWS-FLI1 régule l'expression de *KCNN1* et la production de SK1.

## 2. Etude de la modulation de l'expression de *KCNN1* par EWS-FLI1 à l'aide du plasmide pSK1-lux contenant la région -1497 à +174 du promoteur de *KCNN1*.

Nous avons donc étudié la régulation transcriptionnelle de *KCNN1* à l'aide d'expériences de transfection transitoire dans des cellules de sarcomes osseux avec le plasmide pSK1-Lux (Figure 25A) contenant une partie proximale du promoteur de *KCNN1* situé en amont d'un gène codant la luciférase Gaussia

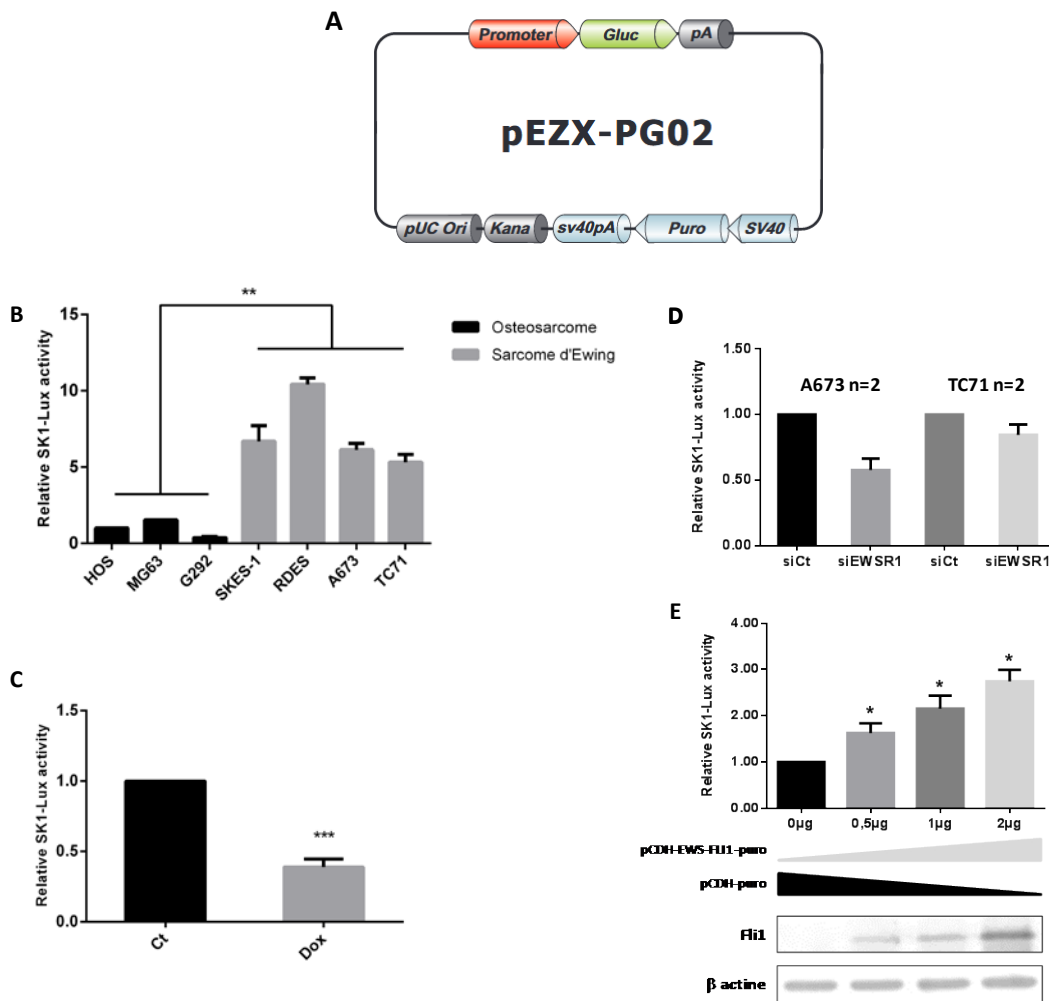


Figure 25 : Etude transcriptionnelle à l'aide de vecteurs gènes rapporteurs. A) Le plasmide pSK1-lux commercial contient la région -1497 à +174 du promoteur de *KCNN1* et est situé en amont du gène codant la luciférase Gaussia. B, C) 3 lignées d'ostéosarcome (HOS, MG63 et G292) et 4 lignées de sarcome d'Ewing (SKES-1, RDES, A673 et TC71) (B) ou la lignée ASP14 traité ou non avec 1µg/mL de doxycycline (C) sont transfectées avec le plasmide pSK1-lux. 48h après transfection, la réponse du promoteur est évaluée par mesure de l'activité luciférase normalisée avec le plasmide pRLTK-lux. L'activité relative est normalisée par apport à la lignée HOS pour la comparaison ostéosarcome et sarcome d'Ewing, ou avec le contrôle non traité pour la lignée ASP14.\*\* p<0.01 ; \*\*\* p<0.001 , Test de Student, n=3 D) les lignée A673 et TC71 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre EWS-FLI1 pendant 72h puis avec le plasmide pSK1-Lux. 48h après transfection, la réponse du promoteur est évaluée comme indiqué ci-dessus. n=2 E) Les cellules COS-7 sont co-transfectées avec le plasmide pSK1-lux et des doses croissantes d'un plasmide codant EWS-FLI1. 48h après transfection, la réponse du promoteur est évaluée comme indiqué ci-dessus. Le taux d'EWS-FLI1 est évalué par western-blot afin de confirmer l'expression d'EWS-FLI1.\*p<0.05 , Test de Student, n=3

La figure 25B montre une réponse transcriptionnelle du promoteur significativement plus importante dans les lignées de sarcome d'Ewing que dans les lignées d'ostéosarcome.

Les expériences réalisées à l'aide de ce même plasmide (-1496/+174-SK1-lux) dans la lignée ASP14, montrent, une diminution (environ 60%) de la réponse transcriptionnelle du promoteur (Figure 25C) après diminution de l'expression d'EWS-FLI1 ce qui suggère une régulation transcriptionnelle de *KCNN1* par EWS-FLI1.

Pour conforter ces résultats nous avons réalisé une co-transfection transitoire du plasmide pSK1-Lux avec un « pool » de siRNA dirigé contre EWS-FLI1 dans les lignées A673 et TC71 (Figure 25D). Nous observons ainsi une diminution de la réponse transcriptionnelle du promoteur après une diminution de l'expression d'EWS-FLI1, dans deux lignées de sarcomes d'Ewing : A673 et TC71.

Enfin, nous avons montré également qu'en co-transfectant de manière transitoire des cellules COS-7 avec le plasmide pSK1-Lux et des doses croissantes de plasmide codant EWS-FLI1 (Figure 25E) nous pouvons potentialiser la réponse transcriptionnelle du promoteur montrant encore le rôle d'EWS-FLI1 dans la régulation de *KCNN1*.

### **3. EWS-FLI1 se lie au promoteur proximal de *KCNN1***

Suite aux résultats précédents nous avons souhaité étudier les mécanismes de régulation de l'expression de *KCNN1* par EWS-FLI1 et plus précisément nous avons tenté par diverses approches de déterminer si EWS-FLI1 se fixait sur le promoteur de *KCNN1*.

Pour cela nous avons tout d'abord réalisé des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine afin d'identifier les régions potentielles de fixation d'EWS-FLI1 sur le promoteur de *KCNN1*.

Ensuite nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire avec différentes délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* pour affiner la région de régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1.

#### **3.1. Etude de la fixation d'EWS-FLI1 au promoteur de *KCNN1* par CHIP**

Nous avons utilisé pour nos expériences d'immuno-précipitation de la chromatine, des couples d'amorces sur l'ensemble des régions du promoteur de *KCNN1* entre -1497 et +61 du site d'initiation de la traduction.

Nous avons dans un premier temps établi les conditions optimales de sonication pour les expériences de CHIP sur les deux lignées de sarcome d'Ewing A673 et TC71 (Figure 26A). Après avoir fixé les cellules en formaldéhyde 1%, extraits la chromatine nous avons testé trois conditions de sonication, à savoir 35, 40, et 45 cycles (à raison de 30sec ON / 30sec OFF, à forte intensité) (Figure 26B).

Les conditions utilisant un nombre de 35 et 40 cycles donnent, pour les deux lignées testées, un « smear » étendu ce qui pourrait nuire à l'interprétation des réactions de CHIP. En effet la taille des produits de PCR attendus est aux environs de 450bp pour chacune des réactions réalisées (Figure 26D). Ainsi, une fragmentation insuffisante de la chromatine pourrait induire des réactions faussement

positives avec certains couples d'amorces du fait qu'un fragment de chromatine obtenu pourrait servir de brin matrice à différents couples d'amorces pour les réactions de PCR quand bien même les régions étudiées ne présenteraient pas de zones de chevauchement.

Pour la condition utilisant 45 cycles de sonication, nous obtenons pour chacune des lignées testées, un « smear » avec une accumulation des produits de sonication aux environs de 400bp ce qui permet de réaliser nos réactions de PCR dans des conditions optimales.

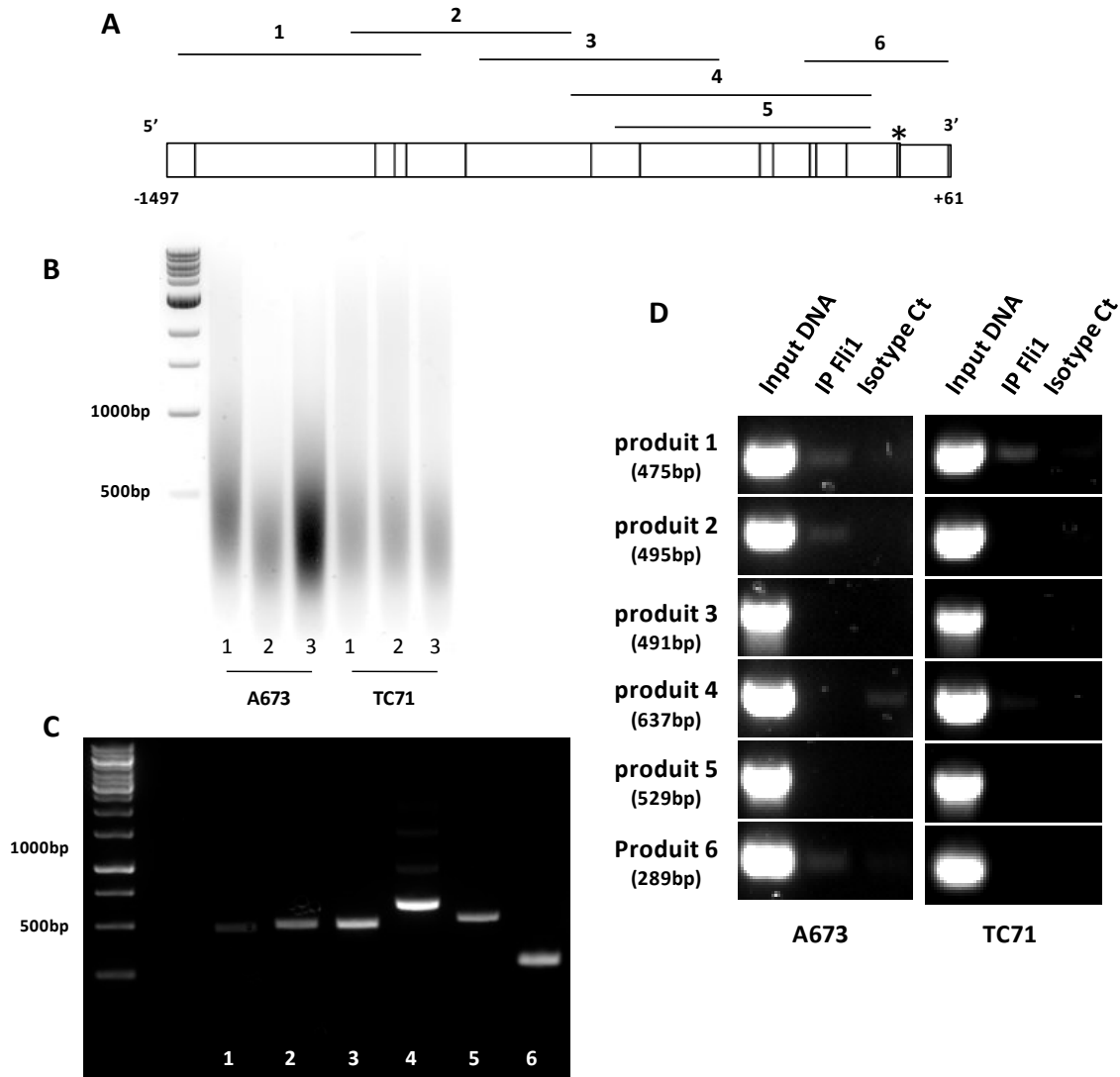


Figure 26 : FLI1 se fixe sur le promoteur proximal de *KCNN1*. A) Schéma de la région du promoteur de *KCNN1* entre -1497 à +61. Les barres noires représentent les sites de liaison potentiels d'EWS-FLI1 au promoteur. Les barres numérotées correspondent aux emplacements des différents produits de PCR réalisés après immuno-précipitation. B, C) Optimisation des conditions expérimentales d'immuno-précipitation de la chromatine. B) Optimisation des conditions de sonication : 2 lignées de sarcome d'Ewing (A673 et TC71) ont été fixées 9min au formol 1% et la chromatine a été extraite puis soniquée 35 (pistes 1), 40 (pistes 2), ou 45 cycles (pistes 3). L'efficacité de la sonication a ensuite été vérifiée sur gel d'agarose à 1,2%. C) 100ng d'ADNg de la lignée SKES-1 ont été utilisés par réaction de PCR pour optimiser les 6 couples d'amorces utilisés. Après amplification les produits de PCR sont mis à migrer sur gel d'agarose afin de vérifier la bonne taille des produits de PCR obtenus. D) 15µg de chromatine extraite et soniquée 45 cycles ont été immuno-précipités avec 3µg d'anticorps anti-FLI1 (IP FLI1), ou d'isotype contrôle (Isotype Ct) puis la réaction de PCR a été réalisée sur la chromatine éluée ainsi que sur la chromatine non immuno-précipitée (Input DNA) avec 6 couples de primers différents de façon à couvrir l'intégralité du promoteur (produits 1 à 6).

D'autre part nous avons pu valider par PCR semi-quantitative les amorces sélectionnées pour les différents couples (Figure 26C). Chacun des couples d'amorces choisis permet l'obtention d'une bande d'amplification à la taille attendue. Seul le couple d'amorces qui correspond aux produits 6 et 4 présente des bandes d'amplification non spécifiques mais qui ne nuit pas à l'interprétation des résultats (Figure 26 C :piste 4 et 6). Ces résultats nous ont donc permis de valider les conditions de sonication mais aussi de PCR pour la réaction de ChIP et rendent interprétables les résultats ainsi obtenus après immuno-précipitation de la chromatine.

La figure 26D présente les résultats obtenus pour la réaction de ChIP pour les deux lignées A673 et TC71. Après immuno-précipitation avec un anticorps dirigé contre FLI1 et amplification par PCR des fragments d'ADN obtenus après élution, les deux lignées testées présentent, après migration sur gel d'agarose, une bande pour les produits 1 (lignées A673 et TC71) et 2 (lignée A673).

L'immuno-précipitation avec l'anticorps dirigé contre FLI1 ne présente pas après la réaction de PCR et la migration sur gel des produits 3, 4, et 5 tandis qu'elle permet la détection d'une bande pour le produit 6 uniquement pour la lignée A673.

En considérant la localisation des séquences des amorces utilisées pour la ChIP, ces résultats permettent de mettre en évidence une région de fixation de FLI1 sur le promoteur proximal de *KCNN1* se situant entre -1497 et -1005.

Afin d'affiner la région du promoteur régulée par EWS-FLI nous avons donc réalisé des expériences de délétions en 5' du promoteur de *KCNN1*.

### ***3.2. Etude de la régulation transcriptionnelle de KCNN1 par EWS-FLI1 à l'aide de délétions en 5' du promoteur de KCNN1***

Dans un premier temps nous avons réalisé à partir de la construction commerciale pSK1-Lux le sous-clonage de différentes délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* (Figure 27 A).

Après optimisation des conditions de PCR (concentration en  $MgCl_2$ ) nous avons vérifié après purification sur colonne, la taille des produits de PCR obtenus (Figure 27B et C) pour nous assurer que nous avons obtenus des inserts aux bonnes tailles pour le sous-clonage des diverses constructions.

L'obtention de bandes aux poids moléculaires attendus nous a permis ensuite de réaliser la ligation des différents inserts dans le plasmide pGL3-basic digéré avec les enzymes XhoI et HindIII, déphosphorylé, et purifié sur colonne.

Après sélection des clones positifs (voir matériel et méthode), nous avons choisi un clone de chaque construction que nous avons amplifié et envoyé à séquencer afin de vérifier la séquence de chaque insert.

Conjointement au séquençage nous avons vérifié nos clones par digestion enzymatique avec les enzymes XhoI et HindIII (Figure 27 D et E). Dans le même temps nous avons effectué une digestion du plasmide pSK1-Lux commercial avec les enzymes EcoRI et HindIII (Figure 27 D). Cela nous permet de vérifier l'intégrité du plasmide mais aussi et surtout de comparer la taille de l'insert que



nous obtenons pour la construction pSK1-1497-Lux avec celui du plasmide commercial dont la taille doit être proche.

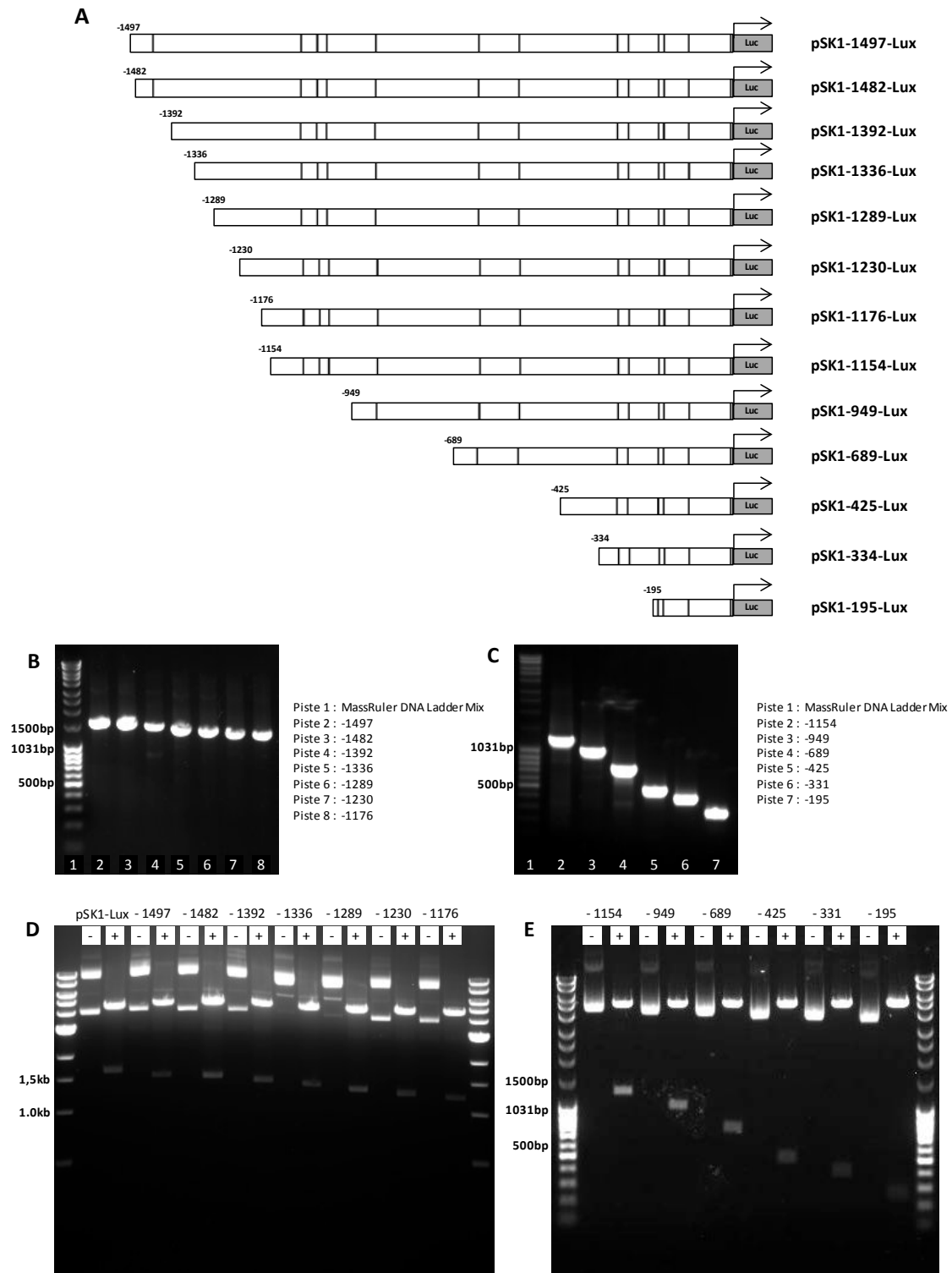


Figure 27 : Construction des délétions en 5' du promoteur de *KCNN1*. A) Représentation schématique des différentes constructions des délétions en 5' du promoteur proximal de *KCNN1* sous-clonées en amont du gène codant la luciférase Firefly dans le vecteur pGL3 basic. Les barres noires représentent les sites de liaison potentiels d'EWS-FLI1 sur le promoteur. B, C) Vérification des produits de PCR purifiés sur gel d'agarose à 1,2%. D, E) Après sélections des clones positifs pour chaque construction, les plasmides ainsi que le plasmide commercial ont été digérés ou non avec les enzymes de restriction XhoI et HindIII ou EcoRI et HindIII (plasmide commercial) puis chaque produit de digestion a été séparé sur gels d'agarose 1% afin de vérifier la taille des inserts.

Après migration sur gel d'agarose des produits de digestion, nous avons pu valider l'ensemble de nos constructions. Concernant l'insert pour la construction pSK1-1497-Lux et celui du plasmide commercial, nous observons une différence d'une taille des inserts (Figure 27D : pistes pSK1-Lux et -1497). Celle-ci s'explique par le fait que la séquence du promoteur clonée dans le plasmide commercial couvre une séquence allant de -1497 à +173 soit une taille de 1670bp au contraire de notre construction pSK1-1497-Lux dont le clonage a été fait pour couvrir la séquence allant de -1497 à +61 soit une taille de 1558bp.

Dans le même temps les résultats obtenus par séquençage ont permis de valider l'ensemble des séquences sous-clonées à l'exception de celle de la construction pSK1-1154-Lux dont nous ne sommes pas servis pour la suite de nos expériences ayant à disposition la construction pSK1-1176-Lux dont la séquence a été validée.

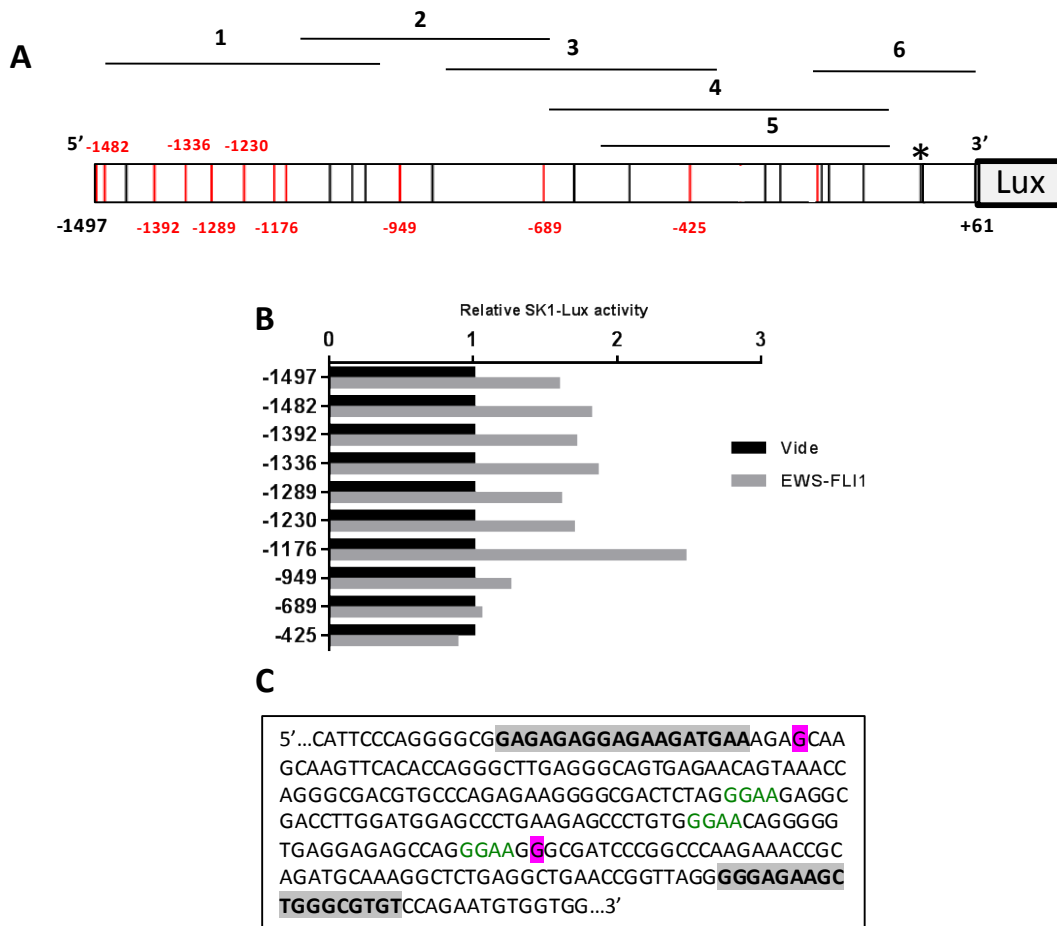


Figure 28: Rôle de la région située entre -1176 et -1005 en amont du site d'initiation dans la régulation de la transcription de *KCNN1* par EWS-FLI1. A) Le plasmide pSK1-lux contient la région -1497 à +61 du promoteur de *KCNN1* et régule l'expression de la luciférase firefly. Les barres noires représentent les sites de liaison potentiels d'EWS-FLI1 sur le promoteur, tandis que les barres rouges représentent la localisation des différentes délétions du promoteurs testées. Les barres numérotées correspondent aux emplacements des différents produits de PCR réalisés par CHIP (cf. Figure 23). B) Les cellules COS-7 ont été transfectées avec les différents constructions du plasmide pSK1-lux en présence ou absence du plasmide de d'expression d'EWS-FLI1. 48h après transfection, la réponse du promoteur est évaluée par mesure de l'activité luciférase normalisée avec le plasmide pRLTK-lux. C) Séquences du promoteur de *KCNN1* impliquées dans la régulation par EWS-FLI1. G\* et G\*\* en rose correspondent aux bases en 5' respectivement des amorces Qf et Qr des couples 1 et 2 utilisés en CHIP. Les séquences des amorces utilisées pour le sous-clonage des constructions -1176 et -949 sont identifiées en gris et les séquences consensus d'EWS-FLI1 sont en vert.

Afin de valider la construction contenant la séquence entière du promoteur proximal (pSK1-1497-Lux), nous avons co-transfecté de manière transitoire des cellules COS-7 avec le plasmide pSK1-1497-Lux et le plasmide vide ou codant EWS-FLI1 (Figure 28B). Nous observons ainsi une augmentation de la réponse transcriptionnelle de la construction pSK1-1497-Lux.

De la même façon nous avons co-transfecté différentes délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* (Figure 28A) avec un plasmide vide ou codant EWS-FLI1 (Figure 28B). L'utilisation de ces différentes délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* suggère un rôle crucial de la séquence située entre -1176 et -949 en amont du site d'initiation pour la régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1.

En effet la figure 25 B montre une très faible augmentation de l'activité promotrice pour la construction -949 lorsqu'on exprime EWS-FLI1 dans des cellules COS-7 alors que l'on constate une forte augmentation de l'activité promotrice avec la construction -1176 lorsqu'on exprime EWS-FLI1.

Ces résultats, corrélés à ceux de ChIP suggèrent que la région -1176 à -1005 contient une séquence permettant une régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1 (Figure 28 C). En observant cette région sur la séquence du promoteur nous observons la présence de 3 séquences GGAA connues comme étant des séquences de fixation d'EWS-FLI1 (Figure 28C, en vert).

#### **4. Identification de l'élément de réponse à EWS-FLI1 : Mise au point des expériences d'EMSA**

Afin de pouvoir étudier plus finement cette région du promoteur proximal de *KCNN1*, nous avons développé un protocole de gel retard ou EMSA permettant d'étudier les interactions protéine-ADN sur de courtes séquences.

##### ***4.1. Etude de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde d'ADN contenant une séquence consensus d'EWS-FLI1***

Afin de mettre au point le protocole d'EMSA, nous avons tout d'abord validé la méthode d'extraction des protéines nucléaires en réalisant des extractions sur des cellules ASP14 traitées ou non à la doxycycline pendant 2 ou 4 jours selon les résultats obtenus en figure 23.

L'extinction à l'aide d'un shRNA inductible à la doxycycline montre une forte diminution d'EWS-FLI1 après 4 jours de traitement des cellules dans la fraction nucléaire (Figure 29 A). Ces résultats montrent que les conditions d'extraction des protéines nucléaires sont donc optimales pour tester l'interaction entre EWS-FLI1 et notre sonde couplée à un fluorochrome 800CW (émission à 800nm).

Afin de valider les conditions expérimentales pour le protocole d'EMSA nous avons choisi d'utiliser des extraits protéiques nucléaires de la lignée A673 afin de travailler sur le même type cellulaire qu'utilisé en ChIP.

Ainsi après migration et acquisition du gel (Figure 29 B), nous constatons toujours la formation d'un complexe « de retard » protéine-sonde marquée (Figure 29 B, pistes 1 et 7) capable d'être dissocié avec des doses croissantes de sondes non marquées (Figure 29 B, pistes 2 à 6). Ce complexe

est capable d'être « super-retardé » lorsqu'il est pré-incubé avec un anticorps dirigé contre FLI1 (Figure 29B, pistes 8 et 9).

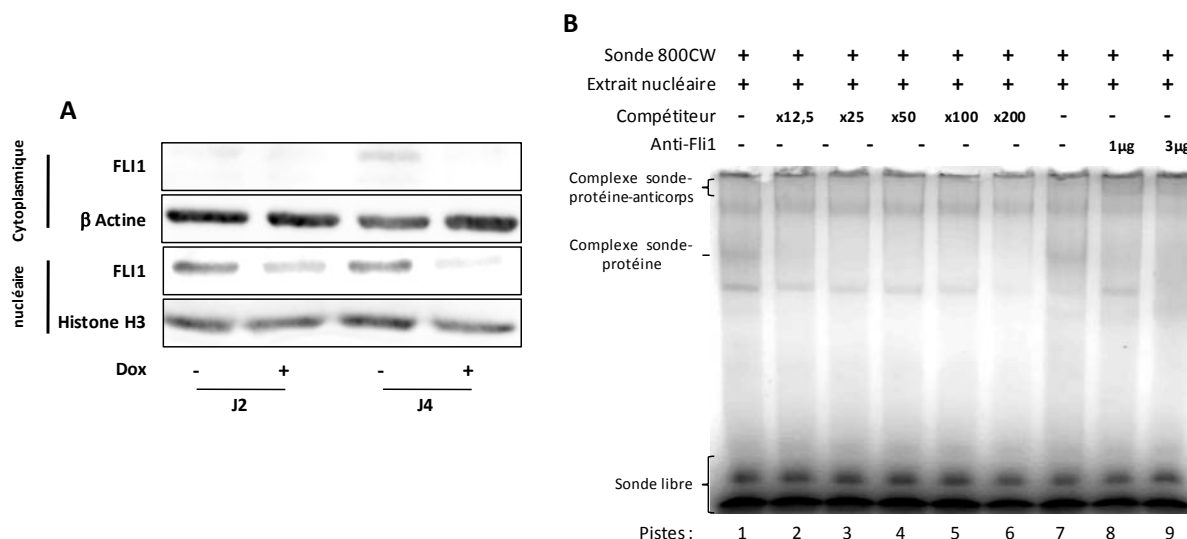


Figure 29 : Mise au point du protocole d'EMSA par identification de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde double brin contenant un motif GGAA (séquence consensus) à l'aide d'extrait protéique nucléaire de la lignée A673. A) Le protocole d'extraction des protéines nucléaires a été validé par western blot sur la lignée ASP14 traitée ou non avec 1µg/mL de doxycycline pendant 2 ou 4 jours. B) La sonde couplée 800CW en 5' est incubée en présence d'extrait protéique nucléaire de la lignée A673 (pistes 1 et 7), en présence ou non de doses croissantes de sonde non marquée (pistes 2 à 6), et en présence ou non de doses croissantes d'anticorps dirigé contre FLI1 (pistes 8 et 9).

Néanmoins ce complexe sonde-protéine-anticorps ne semble pas varier d'intensité selon que nous utilisons 1 ou 3µg d'anticorps.

Ces résultats suggèrent que nos conditions expérimentales d'EMSA semblent adaptées à l'étude de l'interaction du facteur de transcription EWS-FLI1 endogène avec notre sonde fluorescente contenant une séquence consensus d'EWS-FLI1.

Cependant la bande obtenue pour le « super-retard » n'étant pas clairement identifiable, il nous est apparu indispensable d'utiliser un système artificiel (protéine recombinante tagguée) pour nous permettre d'identifier avec certitude la bande de « super-retard ».

#### 4.2. Construction du vecteur d'expression FLAG-HA-EWS-FLI1-pcDNA3.1

Nous avons ainsi sous-cloné la séquence codante d'EWS-FLI1 (Figure 30 A : bande à 1,5kb) dans un plasmide FLAG-HA-pcDNA3.1.

Pour vérifier notre clonage, nous avons, sur les 6 clones sélectionnés ainsi que sur les plasmides pCDH-puro-EWS-FLI1 et FLAG-HA-pcDNA3.1, réalisé une digestion enzymatique avec les enzymes NotI et XbaI.

Après migration sur gel d'agarose à 1% des produits de digestion nous avons pu valider 5 clones sur 6. En effet ceux-ci présentent tous un insert à la même taille que l'insert correspondant à la séquence codante d'EWS-FLI1 du plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1. Concernant l'insert pour la construction pSK1-1497-Lux et celui du plasmide commercial, nous observons une différence d'une

taille des inserts. Celle-ci s'explique par le fait que la séquence du promoteur clonée dans le plasmide commercial couvre une séquence allant de -1497 à +173 soit une taille de 1670bp au contraire de notre construction pSK1-1497-Lux dont le clonage a été fait pour couvrir la séquence allant de -1497 à +61 soit une taille de 1558bp.

Dans l'attente des résultats du séquençage, nous avons initié nos premières expériences sur le clone #4 (Figure 30B : piste 6)

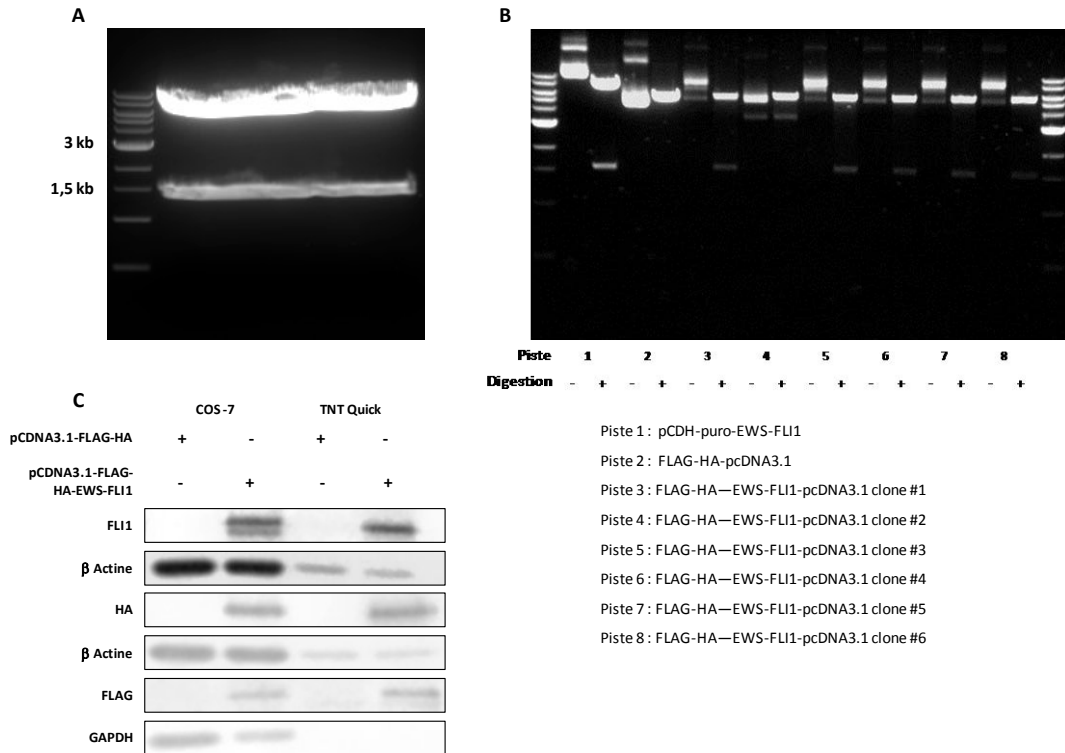


Figure 30 : Construction du plasmide de surexpression de la protéine tagguée FLAG-HA-EWS-FLI1. A) 4x5µg de plasmide pCDH-puro-EWS-FLI1 sont digérés à l'aide des enzymes Xba1 et NotI et séparés sur gel d'agarose à 1%. La bande (à 1,5kb) correspondante à la séquence codante d'EWS-FLI1 est isolée et l'ADN est extrait puis purifié sur colonne. B) Le plasmide FLAG-HA-pcDNA3.1 a été digéré (piste 2) avec les mêmes enzymes, déphosphorylé, et purifié sur colonne. Après ligation et 5 clones positifs (résistance à l'ampicilline) sont amplifiés par mini-préparation, les clones obtenus sont digérés avec les enzymes de restriction Xba1 et NotI et les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose à 1%. C) Les cellules COS-7 ont été transfectées avec 5µg du plasmide FLAG-HA-EWS-FLI1-pcDNA3.1 #4 et les protéines ont été extraites après 72h. La protéine recombinante a été produite à l'aide du système TNT quick coupled transcription/translation à l'aide du même plasmide. L'expression des protéines FLAG, HA et EWS-FLI1 ont été évaluées par western-blot.

Nous avons enfin validé notre sous-clonage en évaluant la production de la protéine EWS-FLI1 doublement taguée FLAG et HA par western-blot (Figure 30C). Pour ce faire nous avons tout d'abord transfecté des cellules COS-7 ensemencées en boîte de 6cm avec 5µg du clone #4 des constructions FLAG-HA-EWS-FLI1-pcDNA3.1.

Nous avons également vérifié la production réalisée à l'aide du même plasmide de notre protéine dans le système acellulaire TNT quick coupled transcription/translation.

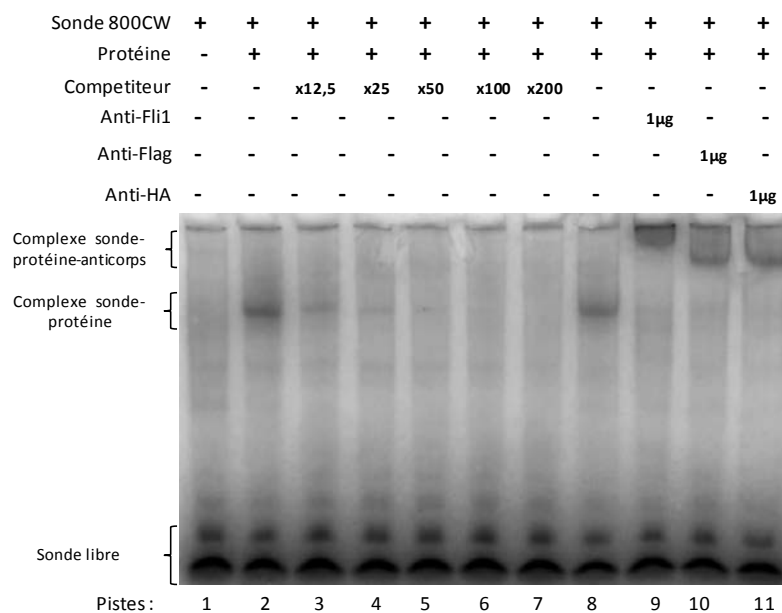
Dans les deux cas, nous observons une bande pour les 3 anticorps testés (FLI1, FLAG, et HA) pour le plasmide codant FLAG-HA-EWS-FLI1 que ce soit dans le modèle cellulaire mais aussi dans le modèle de production de protéine recombinante utilisant le système couplé de transcription/traduction.

Ces résultats nous permettent de valider en attendant le résultat du séquençage, notre construction de sous-clonage d'EWS-FLI1.

**4.3. Etude de l'interaction de la protéine recombinante EWS-FLI1 avec une sonde d'ADN contenant une séquence consensus d'EWS-FLI1**

Afin de valider les résultats expérimentaux obtenus sur les extraits protéiques nucléaires de la lignée A673, nous avons donc reconduit la même expérience avec 1µL de protéine recombinante (1µL de produit de réaction) obtenue à l'aide du système couplé de transcription/traduction *in vitro* (voir matériel et méthode). Nous avons de plus ajouté trois conditions expérimentales supplémentaires, en ajoutant à notre mélange réactionnel des anticorps dirigés soit contre FLI1, soit Flag, soit HA (Figure 31).

Ainsi après migration et acquisition du gel, nous constatons toujours la formation d'un complexe « de retard » protéine-sonde marquée (piste 2) capable d'être dissocié avec des doses croissantes de sondes non marquée (pistes 3 à 7). Ce complexe est capable d'être « super-retardé » lorsqu'il est pré-incubé avec un anticorps dirigé contre FLI1 (piste 9), FLAG (piste 10), et HA (piste 11).



**Figure 31 : Mise au point du protocole d'EMSA par identification de l'interaction d'EWS-FLI1 avec une sonde double brin contenant un motif GGAA (séquence consensus) à l'aide de protéine recombinante. La sonde couplée 800CW en 5' est incubée en présence ou non d'1µL de protéine recombinante, en présence ou non d'excès de sonde non marquée, et en présence ou non d'1µg d'anticorps anti-FLI1, anti-FLAG, ou anti-HA.**

L'ensemble de ces résultats permettent de valider les conditions expérimentales d'EMSA qui nous permettront de réaliser nos expériences sur le promoteur de *KCNN1* afin de déterminer le ou les éléments de réponse à EWS-FLI1.

### III- *KCNN1* module la prolifération cellulaire et la croissance tumorale dans les sarcomes d'Ewing

Afin d'évaluer l'implication de *KCNN1* dans divers processus biologiques nous avons réalisé une extinction du gène par une approche moléculaire à l'aide de deux shRNA dirigés contre *KCNN1* sur la lignée de sarcome d'Ewing TC71.

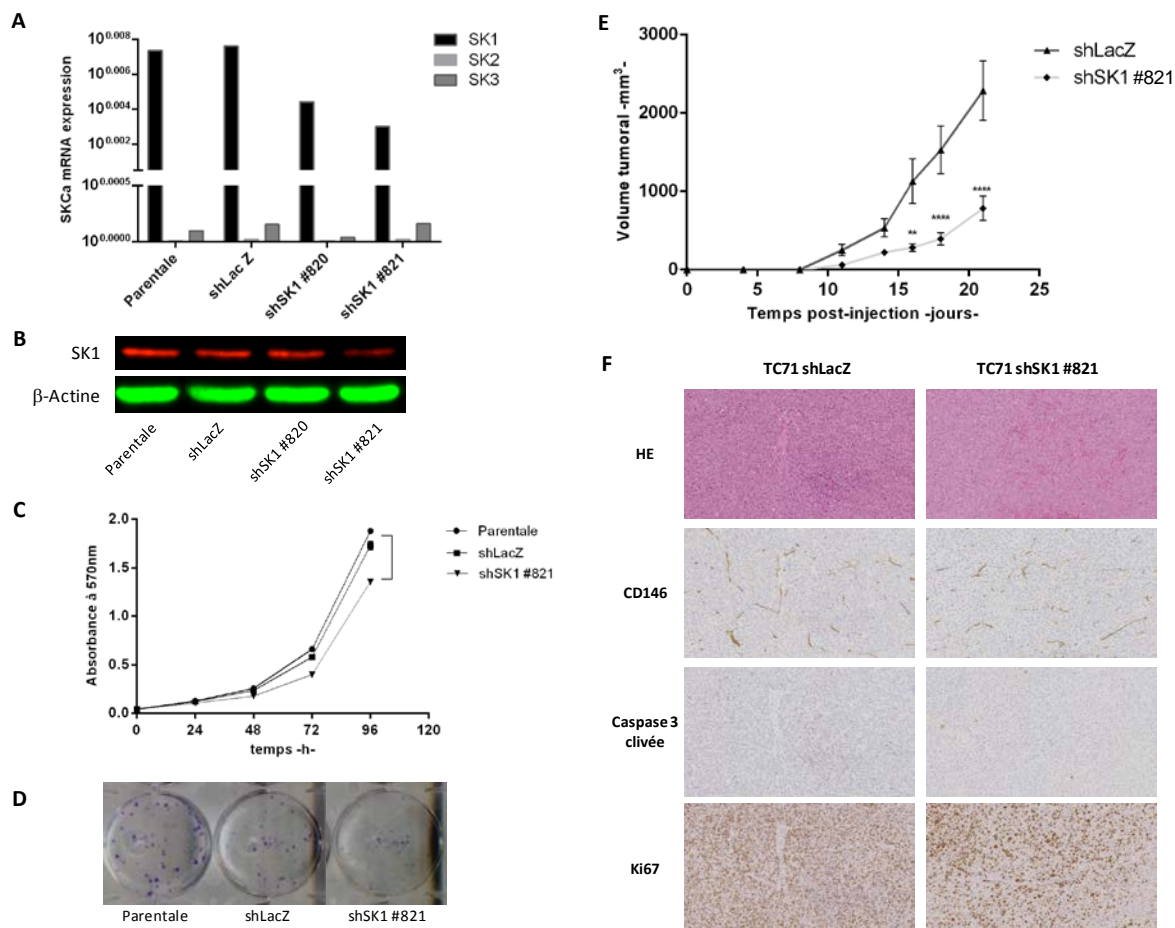


Figure 32 : L'extinction de *KCNN1* module la prolifération cellulaire in vitro et la croissance tumorale in vivo. A, B, C, et D) L'extinction moléculaire de *KCNN1* a été réalisée dans la lignée TC71 par transfection stable à l'aide d'un shRNA. Celle-ci a été vérifiée par RT-qPCR (A) et western blot (B). Afin de vérifier la spécificité de l'extinction de *KCNN1*, l'expression des gènes *KCNN2* et *KCNN3* ont été vérifiés par RT-qPCR (A). L'évaluation de l'impact de l'extinction de *KCNN1* sur la prolifération cellulaire a été réalisée par un test de prolifération (crystal violet) à différents temps (C), et par clonogénicité (D). E) Après injection en para-tibiale de 2M de cellules TC modifiées avec un shLacZ (contrôle) ou avec le shSK1 #821, le volume tumorale a été suivi au cours du temps jusqu'au sacrifice. \*\* p<0.005 ; \*\*\*\* p<0.0001, Test Anova 2 voies, avec test post hoc de Sidak, n=7 souris par groupe. F) Après sacrifice les tumeurs sont analysées histologiquement afin d'évaluer l'expression de marqueurs tumoraux (vascularisation, apoptose, et prolifération) que sont le CD146, la caspase 3 clivée, et le Ki67.

Les résultats obtenus par RT-qPCR montrent une diminution de l'expression de *KCNN1* pour les deux shRNA avec une diminution plus importante pour le shRNA #821 (Figure 32A). Les expériences de western blot réalisées sur les extraits protéiques confirment ces résultats avec une nette diminution du taux de SK1 dans la lignée transduite avec le shRNA #821 (Figure 32B).

*In vitro*, les premières expériences de prolifération cellulaire réalisées avec un test au crystal violet (Figure 32C) et de clonogénicité (figure 32D) montrent que l'extinction de *KCNN1* induit une baisse de la prolifération cellulaire (environ 25%) ainsi que de la capacité des cellules tumorales à créer des clones.

Ces résultats se confirment *in vivo*, puisque la croissance tumorale se retrouve considérablement ralentie (Figure 32E) au regard de la croissance tumorale des souris du groupe contrôle. Cependant à l'examen histologique, et selon les premiers résultats, l'indice de prolifération cellulaire (Figure 32F marquage Ki67) ne montre pas de variation, de la même manière que les marqueurs caspase3 clivée (apoptose) et CD146 (angiogénèse).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression de *KCNN1* participe au contrôle de la prolifération cellulaire et la croissance de la tumeur primaire dans un modèle préclinique de sarcome d'Ewing



## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Depuis l'identification des canaux potassiques activés par le calcium par Gardos en 1958 (Gárdos, 1958), et le premier clonage des canaux SKCa (Köhler *et al.*, 1996), ces derniers ont été décrits comme étant impliqués dans de nombreux processus biologiques dans des tissus dits « électriquement excitables ». Plus récemment ces canaux ont été décrits, en particulier le canal SK3, comme étant directement impliqué dans la physiopathologie de certains cancers (Girault *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus démontrent l'expression de *KCNN1* dans des cellules tumorales, celles du sarcome d'Ewing, mais également au sein de tissus tumoraux de patients atteints de sarcome d'Ewing. Cette expression apparaît comme étant corrélée à un taux de survie à 5 ans sans évènement chez ces patients. Néanmoins, et bien que nous ayons démontré l'expression de *KCNN1* au niveau de transcriptomique et protéique dans différentes lignées de sarcome d'Ewing, il reste fondamental de confirmer l'existence d'un canal membrane fonctionnel dans ce type de lignée cellulaire par électrophysiologie (collaboration avec le laboratoire du Pr Christophe Vandier, Tours). De plus, il nous paraît primordial de confirmer au niveau protéique sur des biopsies de patients, l'expression de *KCNN1*. La mise en place d'une méthode d'immunomarquage du canal potassique activé par le calcium SK1 sur ces biopsies de patients pourrait constituer, à terme, un outil diagnostique pour les anatomo-pathologistes.

Le sarcome d'Ewing possède une signature moléculaire singulière avec la présence d'un gène de fusion codant, dans 85% des cas, le facteur de transcription EWS-FLI1, décrit comme régulant divers voies de signalisation comme les voies SHH (Sonic Hedgehog) et du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (Lézet *et al.*, 2020; Mackintosh *et al.*, 2010; Mullard *et al.*, 2020).

Par une approche d'extinction de fonction, nos résultats montrent une régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1. Dans une lignée de sarcome d'Ewing modifiée pour exprimer stablement un shRNA dirigé contre EWS-FLI1 inductible à la doxycycline, on observe une diminution de l'expression d'*EWS-FLI* au niveau transcriptomique mais aussi au niveau protéique ce qui conduit à une diminution de l'expression de *KCNN1* tant au niveau du transcrit que de la protéine. Afin de vérifier la spécificité de cette diminution d'expression liée à EWS-FLI1, nous avons à l'aide de transfection transitoire utilisant des siRNA dirigés contre EWS-FLI1 montré sur 4 lignées de sarcome d'Ewing (A673, RDES, TC71, et SKES-1) qu'une diminution d'EWS-FLI1 est associée à une diminution de l'expression de *KCNN1* confirmant nos résultats précédents. Néanmoins il nous semble primordial de reproduire ces expériences pour présenter un nombre de réplicat à même de confirmer les tendances observées pour deux de ces lignées (RDES, et SKES1).

D'autre part, ce travail nous a permis de démontrer, par des études de vecteurs gènes rapporteurs, une augmentation de l'activité promotrice de *KCNN1* par EWS-FLI1 dans différentes lignées de sarcome d'Ewing, mais aussi que cette activité promotrice est diminuée lorsque nous avons à l'aide de siRNA (lignée A673 et TC71) et shRNA (lignée ASP14) dirigé contre EWS-FLI1 diminué son expression. Il conviendra cependant de reproduire nos expériences sur les lignées A673 et TC71 mais

aussi de les réaliser sur les lignées RDES et SKES-1 pour conforter les premiers résultats obtenus avec le « pool » de siRNA dirigé contre EWS-FLI1. A l'inverse cette réponse transcriptionnelle du promoteur est augmentée lorsque nous avons exprimé EWS-FLI1 dans la lignée COS-7.

Les premières expériences réalisées par immuno-précipitation de la chromatine, mais aussi à l'aide de différentes délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* suggèrent une régulation au niveau transcriptionnel de *KCNN1* par EWS-FLI1 et nous a permis d'identifier la région -1154/-1005 en amont du site d'initiation comme étant majeur pour la régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1.

Il nous semble donc fondamental de reproduire ces expériences dans les prochains mois afin de confirmer l'ensemble de ces résultats. En ce sens il nous apparaît primordial de réaliser des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine sur des régions plus restreintes du promoteur en utilisant des couples d'oligonucléotides permettant d'obtenir des produits de PCR d'environ 150pb plus à même de permettre l'identification de la région du promoteur proximal de *KCNN1* régulée par EWS-FLI1.

De plus, cette région singulière du promoteur de *KCNN1* présente plusieurs motifs GGAA décrits dans la littérature comme éléments de réponse à EWS-FLI1 (Gangwal *et al.*, 2008). Ainsi, afin de caractériser l'élément de réponse à EWS-FLI1 du promoteur de *KCNN1*, et ses mécanismes de régulation, nous envisageons d'effectuer des expériences de mutagenèse dirigée (mutation d'un ou plusieurs sites) pour confirmer le rôle majeur d'une ou de ces séquences.

A l'aide de ces résultats nous pourrions enfin envisager, par des expériences de retard sur gel (EMSA), de caractériser précisément la séquence consensus de fixation du promoteur de *KCNN1* à EWS-FLI1.

Bien que l'ensemble de ces résultats suggèrent une régulation directe de *KCNN1* par EWS-FLI1, il nous paraît important d'étudier la présence ou non de co-facteur au sein du complexe transcriptionnel dans la régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1.

L'inflammation, les facteurs de croissance, mais aussi le contexte hypoxique ont été décrits comme étant impliqués dans les processus de progression tumorale mais aussi de dissémination métastatique et de résistances aux agents de chimiothérapies (Bailey *et al.*, 2016; Garofalo *et al.*, 2012; Radons, 2014). Nous avons pu identifier grâce à la séquence du promoteur proximal de *KCNN1* de multiples éléments de réponses à des facteurs du microenvironnement tumoral. L'obtention par ce travail des différentes constructions de délétions en 5' du promoteur de *KCNN1* nous offre ainsi la possibilité d'étudier d'autres mécanismes de régulation de *KCNN1* dans les sarcomes d'Ewing.

Dans un second temps nous avons cherché à évaluer le rôle de l'expression de *KCNN1* dans le développement des sarcomes d'Ewing. Par une approche d'extinction moléculaire utilisant des shRNA dirigés contre *KCNN1*, nous avons montré dans nos premières expérimentations réalisées *in vitro* suggèrent que *KCNN1* est impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules du sarcome d'Ewing.

Néanmoins il nous paraît primordial de réaliser de nouvelles expériences avec d'autres shRNA dirigés contre *KCNKI*. En effet, le suivi longitudinal réalisé par qPCR sur nos cellules transduites avec les shRNA dirigés contre *KCNKI* utilisés dans notre étude, montre une perte de l'extinction après plusieurs passages des cellules. Cette observation, dans des conditions de sélection à l'aide d'un antibiotique, la puromycine, démontre la sélection dans le temps de clone n'exprimant pas ou peu le shRNA tandis qu'elle devienne résistante à l'antibiotique.

Pour résoudre ce problème nous testons la transduction des cellules de sarcome d'Ewing à l'aide de particules lentivirales permettant l'expression d'un shRNA inductible à la doxycycline. Cette solution nous permettra de décrire précisément l'implication de *KCNKI* dans la prolifération cellulaire par l'apport d'un outil qui nous permettra de contrôler l'expression du shRNA.

Ainsi, afin de comprendre les mécanismes entrant en jeu dans ce processus de contrôle de la prolifération cellulaire, nous allons poursuivre l'étude afin d'évaluer l'implication de l'extinction de *KCNKI* dans le contrôle du cycle cellulaire et/ou dans sa capacité à induire l'apoptose.

En effet, la littérature décrit l'implication des canaux potassiques dans la régulation du cycle et de la prolifération cellulaire et les phénomènes d'apoptose (Huang and Jan, 2014; Urrego *et al.*, 2014).

Ainsi l'activation du canal potassique activé par le calcium de conductance intermédiaire  $KCa_{3.1}$  stimule la prolifération des cellules du cancer de la prostate (Parihar *et al.*, 2003) et inhibe la prolifération d'une lignée de kératinocyte et de gliome (Koegel *et al.*, 2003).

D'autre part, d'autres travaux montrent que les canaux potassiques peuvent être impliqués dans le phénomène d'apoptose (Burg *et al.*, 2006). La surexpression dans divers types cellulaires (Krick *et al.*, 2001) des canaux potassiques induirait une apoptose par efflux massif d'ions  $K^+$ . Cependant une activité très importante des canaux potassiques  $SKCa$  est capable d'induire un influx massif en retour d'ion  $Ca^{2+}$ , via les canaux calciques associés ORAI, capable de jouer à la fois sur les processus de prolifération cellulaire mais aussi d'apoptose (Berridge *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le canal  $SK1$  possède en son extrémité C-terminale un domaine de liaison de la calmoduline, qui est une protéine régulatrice du calcium intracellulaire. Cette protéine est impliquée dans de très nombreux processus biologiques (Berchtold and Villalobo, 2014) en participant activement au transport du  $Ca^{2+}$  cytosolique vers les protéines calcium dépendantes et promouvoir leur activation.

Conjugués à nos premiers résultats expérimentaux quant à l'implication de *KCNKI* dans le développement des sarcomes d'Ewing, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une surexpression du canal  $SK1$  dans le sarcome d'Ewing conjuguée à une activité très importante de canaux calciques associés, engendrerait un influx massif de  $Ca^{2+}$  via les canaux ORAI. Cette augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire faciliterait l'activation via la calmoduline de protéines calcium dépendantes actrices du cycle et de la prolifération cellulaire.

Ces hypothèses devront être expérimentées à l'aide d'outils de biologies cellulaires (inhibiteurs pharmacologiques) et moléculaires (si et shRNA) permettant d'identifier le ou les partenaires

calciques associés, de nouveau dans l'hypothèse de la présence d'un canal SK1 fonctionnel. En outre, l'apport de l'imagerie calcique, ainsi que la mesure par électrophysiologie de l'activité du canal nous permettrons de décrypter plus finement les mécanismes qui entrent en jeu dans le contexte de notre étude.

Enfin, les premières expériences réalisées à l'aide de modèles de xélogreffe orthotopique chez la souris, montrent que *KCNN1* participe au contrôle de la croissance tumorale *in vivo*. Nous souhaitons poursuivre ce travail à l'aide d'autres lignées de sarcome d'Ewing et à l'aide de différents shRNA dirigés contre *KCNN1*. D'autre part, l'importance du microenvironnement tumoral dans la croissance des sarcomes d'Ewing nous incitera à étudier les effets de la modification de l'expression de *KCNN1* dans les cellules de sarcome d'Ewing sur le remodelage osseux et sur l'angiogenèse tumorale (Mavrogenis et al., 2018).

En conclusion ce travail nous a permis de montrer une expression de *KCNN1* dans tumeurs et des lignées de sarcome d'Ewing. Par ailleurs, cette expression est régulée par EWS-FLI1, et participe au contrôle de la prolifération cellulaire *in vitro* et à la croissance de la tumeur primaire dans un modèle préclinique de sarcome d'Ewing. Enfin il convient de souligner qu'EWS-FLI1 se lie à la calmoduline et pourrait donc réguler positivement ou négativement l'activité du canal SK1 (Figure 33).

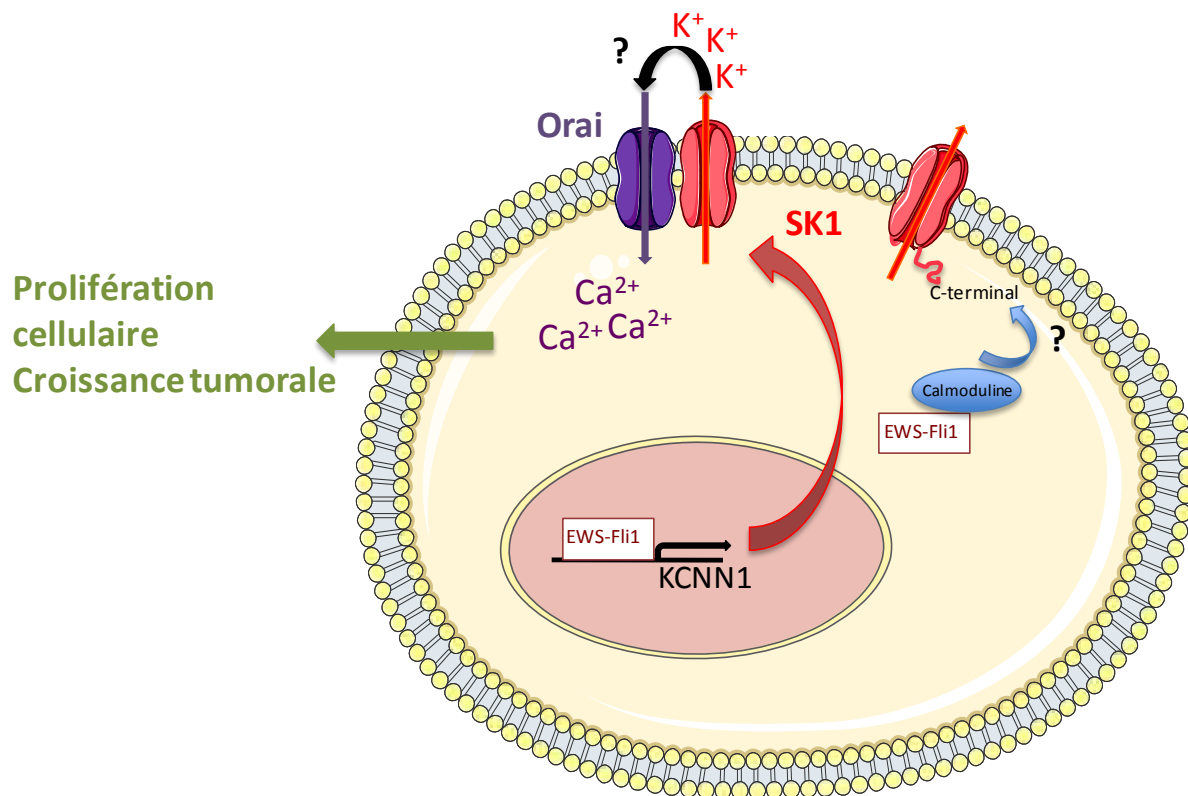


Figure 33 : Proposition de mécanisme de régulation de l'expression de *KCNN1* par EWS-FLI1, et de l'implication de l'expression de *KCNN1* dans les phénomènes de prolifération cellulaire et de croissance tumorale dans les sarcomes d'Ewing.

## **Références bibliographiques**

Adelman, J.P., Clapham, D.E., Hibino, H., Inanobe, A., Jan, L.Y., Karschin, A., Kubo, Y., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Miki, T., *et al.* (2019). Inwardly rectifying potassium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE 2019.

Aggarwal, S.K., and MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16, 1169–1177.

Alaimo, A., Etxeberria, A., Gómez-Posada, J.C., Gomis-Perez, C., Fernández-Orth, J., Malo, C., and Villarroel, A. (2018). Lack of correlation between surface expression and currents in epileptogenic AB-calmodulin binding domain Kv7.2 potassium channel mutants. *Channels Austin Tex* 12, 299–310.

Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Gutman, G.A., Kaczmarek, L.K., Wei, A.D., and Wulff, H. (2019). Calcium- and sodium-activated potassium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE 2019.

Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54, 87–143.

Atkinson, N.S., Robertson, G.A., and Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* 253, 551–555.

Attali, B., Chandy, K.G., Giese, M.H., Grissmer, S., Gutman, G.A., Jan, L.Y., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Nerbonne, J., Pardo, L.A., *et al.* (2019). Voltage-gated potassium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE 2019.

Bailey, K.M., Airik, M., Krook, M.A., Pedersen, E.A., and Lawlor, E.R. (2016). Micro-Environmental Stress Induces Src-Dependent Activation of Invadopodia and Cell Migration in Ewing Sarcoma. *Neoplasia N. Y. N* 18, 480–488.

Bayliss, D.A., Czirják, G., Enyedi, P., Goldstein, S.A.N., Lesage, F., Minor, Jr., D.L., Plant, L.D., Sepúlveda, F., and Winn, B.T. (2019). Two P domain potassium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE 2019.

Ben-David, Y., Giddens, E.B., and Bernstein, A. (1990). Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1332–1336.

Berchtold, M.W., and Villalobo, A. (2014). The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 398–435.

Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R.L., Schuck, A., Teot, L.A., and Juergens, H. (2006). Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *The Oncologist* 11, 503–519.

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.

Bertolotti, A., Lutz, Y., Heard, D.J., Chambon, P., and Tora, L. (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* *15*, 5022–5031.

Blunck, R., and Batulan, Z. (2012). Mechanism of Electromechanical Coupling in Voltage-Gated Potassium Channels. *Front. Pharmacol.* *3*.

Bonito, B., Sauter, D.R.P., Schwab, A., Djamgoz, M.B.A., and Novak, I. (2016). KCa3.1 (IK) modulates pancreatic cancer cell migration, invasion and proliferation: anomalous effects on TRAM-34. *Pflugers Arch.* *468*, 1865–1875.

Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M.S., Müller-Tidow, C., and Richter, G.H.S. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 1991–1996.

Burg, E.D., Remillard, C.V., and Yuan, J.X.-J. (2006). K<sup>+</sup> Channels in Apoptosis. *J. Membr. Biol.* *209*, 3.

Caropreso, V., Darvishi, E., Turbyville, T.J., Ratnayake, R., Grohar, P.J., McMahon, J.B., and Woldemichael, G.M. (2016). Englerin A Inhibits EWS-FLI1 DNA Binding in Ewing Sarcoma Cells. *J. Biol. Chem.* *291*, 10058–10066.

Castillero-Trejo, Y., Eliazar, S., Xiang, L., Richardson, J.A., and Ilaria, R.L. (2005). Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res.* *65*, 8698–8705.

Cavazzana, A.O., Miser, J.S., Jefferson, J., and Triche, T.J. (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am. J. Pathol.* *127*, 507–518.

Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 115–121.

Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., *et al.* (2011). K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* *331*, 768–772.

Clement, J.P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1997). Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* *18*, 827–838.

Comes, N., Bielanska, J., Vallejo-Gracia, A., Serrano-Albarrás, A., Marruecos, L., Gómez, D., Soler, C., Condom, E., Ramón Y Cajal, S., Hernández-Losa, J., *et al.* (2013). The voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Front. Physiol.* *4*, 283.

D'Arcangelo, D., Scatozza, F., Giampietri, C., Marchetti, P., Facchiano, F., and Facchiano, A. (2019). Ion Channel Expression in Human Melanoma Samples: In Silico Identification and Experimental Validation of Molecular Targets. *Cancers* *11*.

Day, M., Carr, D.B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., and Surmeier, D.J. (2005). Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K<sub>leak</sub> channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 8776–8787.



Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., Jong, P. de, Rouleau, G., *et al.* (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359, 162–165.

Desandes, E., Lacour, B., Clavel, J., and le Réseau français des registres de cancers (2016). [Cancer in adolescents and young adults in France: Epidemiology and pathways of care]. *Bull. Cancer (Paris)* 103, 957–965.

Dirksen, U., Brennan, B., Le Deley, M.-C., Cozic, N., van den Berg, H., Bhadri, V., Brichard, B., Claude, L., Craft, A., Amler, S., *et al.* (2019). High-Dose Chemotherapy Compared With Standard Chemotherapy and Lung Radiation in Ewing Sarcoma With Pulmonary Metastases: Results of the European Ewing Tumour Working Initiative of National Groups, 99 Trial and EWING 2008. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 37, 3192–3202.

Du, C., Zheng, Z., Li, D., Chen, L., Li, N., Yi, X., Yang, Y., Guo, F., Liu, W., Xie, X., *et al.* (2016). BKCa promotes growth and metastasis of prostate cancer through facilitating the coupling between  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin and FAK. *Oncotarget* 7, 40174–40188.

Durer, S., and Shaikh, H. (2020). Cancer, Ewing Sarcoma. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Esiashvili, N., Goodman, M., and Marcus, R.B. (2008). Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 30, 425–430.

Fang, Y., Schram, G., Romanenko, V.G., Shi, C., Conti, L., Vandenberg, C.A., Davies, P.F., Nattel, S., and Levitan, I. (2005). Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C1134-1144.

Fatt, P., and Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* 120, 171–204.

Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P.C., Kinsey, M., Haroldsen, S.C., Shah, A.A., Boucher, K.M., Watkins, W.S., Jorde, L.B., Graves, B.J., *et al.* (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10149–10154.

Gárdos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 653–654.

Garofalo, C., Mancarella, C., Grilli, A., Manara, M.C., Astolfi, A., Marino, M.T., Conte, A., Sigismund, S., Carè, A., Belfiore, A., *et al.* (2012). Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-IR agents in Ewing's sarcoma. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 26, 1603–1616.

Girault, A., Haelters, J.-P., Potier-Cartreau, M., Chantome, A., Jaffres, P.-A., Bougnoux, P., and Vandier, V.J. and C. (2012). Targeting SKCa Channels in Cancer: Potential New Therapeutic Approaches.

Goldstein, S.A., Price, L.A., Rosenthal, D.N., and Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13256–13261.

González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012). K<sup>+</sup> Channels: Function-Structural Overview. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 2087–2149.

González, I., Vicent, S., de Alava, E., and Lecanda, F. (2007). EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85, 1015–1029.

Gordon, D. (1990). Ion channels in nerve and muscle cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 695–707.

Grandí, E., Sanguinetti, M.C., Bartos, D.C., Bers, D.M., Chen-Izu, Y., Chiamvimonvat, N., Colecraft, H.M., Delisle, B.P., Heijman, J., Navedo, M.F., *et al.* (2017). Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J. Physiol.* 595, 2209–2228.

Grünewald, T.G.P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E.M., de Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P.H., Delattre, O., and Dirksen, U. (2018). Ewing sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4, 1–22.

Guéguinou, M., Chantôme, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., and Potier-Cartereau, M. (2014). KCa and Ca<sup>2+</sup> channels: The complex thought. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 2322–2333.

Guéguinou, M., Gambade, A., Félix, R., Chantôme, A., Fourbon, Y., Bougnoux, P., Weber, G., Potier-Cartereau, M., and Vandier, C. (2015). Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca<sup>2+</sup> channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848, 2603–2620.

Guillon, N., Tirode, F., Boeva, V., Zynovyev, A., Barillot, E., and Delattre, O. (2009). The Oncogenic EWS-FLI1 Protein Binds In Vivo GGAA Microsatellite Sequences with Potential Transcriptional Activation Function. *PLoS ONE* 4.

Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., *et al.* (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 473–508.

He, C., Zhang, H., Mirshahi, T., and Logothetis, D.E. (1999). Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 12517–12524.

Hemmerlein, B., Weseloh, R.M., Mello de Queiroz, F., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M.E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz-Joachim-Radzun, null, *et al.* (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol. Cancer* 5, 41.

Heymann, D., and Rédini, F. (2011). Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. *IBMS BoneKEy* 8, 402–414.

Honoki, K., Stojanovski, E., McEvoy, M., Fujii, H., Tsujiuchi, T., Kido, A., Takakura, Y., and Attia, J. (2007). Prognostic significance of p16INK4a alteration for Ewing sarcoma. *Cancer* 110, 1351–1360.

Horn, M., Geisen, C., Cermak, L., Becker, B., Nakamura, S., Klein, C., Pagano, M., and Antebi, A. (2014). DRE-1/FBXO11-dependent degradation of BLMP-1/BLIMP-1 governs *C. elegans* developmental timing and maturation. *Dev. Cell* 28, 697–710.

Huang, X., and Jan, L.Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *J. Cell Biol.* 206, 151–162.

Huang, C.L., Feng, S., and Hilgemann, D.W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391, 803–806.

Huang, H.-Y., Illei, P.B., Zhao, Z., Mazumdar, M., Huvos, A.G., Healey, J.H., Wexler, L.H., Gorlick, R., Meyers, P., and Ladanyi, M. (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 548–558.

Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D.E., and Triche, T.J. (2005). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 65, 4633–4644.

Ibrahim, S., Dakik, H., Vandier, C., Chautard, R., Paintaud, G., Mazurier, F., Lecomte, T., Guéguinou, M., and Raoul, W. (2019). Expression Profiling of Calcium Channels and Calcium-Activated Potassium Channels in Colorectal Cancer. *Cancers* 11.

Iwanir, S., and Reuveny, E. (2008). Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch.* 456, 1097–1108.

Jäger, H., Adelman, J.P., and Grissmer, S. (2000). SK2 encodes the apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS Lett.* 469, 196–202.

Jehle, J., Schweizer, P.A., Katus, H.A., and Thomas, D. (2011). Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell Death Dis.* 2, e193.

Ji, C.-D., Wang, Y.-X., Xiang, D.-F., Liu, Q., Zhou, Z.-H., Qian, F., Yang, L., Ren, Y., Cui, W., Xu, S.-L., et al. (2018). Kir2.1 Interaction with Stk38 Promotes Invasion and Metastasis of Human Gastric Cancer by Enhancing MEKK2-MEK1/2-ERK1/2 Signaling. *Cancer Res.* 78, 3041–3053.

Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339.

Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690–695.

Kim S, Ct, D., and R, W. (2006). Cooperative DNA binding with AP-1 proteins is required for transformation by EWS-Ets fusion proteins (*Mol Cell Biol*).

Koegel, H., Kaesler, S., Burgstahler, R., Werner, S., and Alzheimer, C. (2003). Unexpected Down-regulation of the hIK1 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> Channel by Its Opener 1-Ethyl-2-benzimidazolinone in HaCaT Keratinocytes INVERSE EFFECTS ON CELL GROWTH AND PROLIFERATION. *J. Biol. Chem.* 278, 3323–3330.

Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., and Adelman, J.P. (1996). Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Mammalian Brain. *Science* 273, 1709–1714.

Kovar, H. (2010). Downstream EWS/FLI1 - upstream Ewing's sarcoma. *Genome Med.* 2, 8.

Kramer, J.W., Post, M.A., Brown, A.M., and Kirsch, G.E. (1998). Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits. *Am. J. Physiol.* 274, C1501-1510.

Krick, S., Platoshyn, O., Sweeney, M., Kim, H., and Yuan, J.X.-J. (2001). Activation of K<sup>+</sup> channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 280, C970–C979.

Kshatri, A.S., Gonzalez-Hernandez, A., and Giraldez, T. (2018). Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca<sup>2+</sup> Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front. Mol. Neurosci.* 11.

Ladenstein R, U, P., Mc, L.D., J, W., M, P., O, O., H, van den B., U, D., L, H., J, M., et al. (2010). Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial (*J Clin Oncol*).

Lamora, A., Talbot, J., Mullard, M., Brounais-Le Royer, B., Redini, F., and Verrecchia, F. (2016). TGF- $\beta$  Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* 5.

Le Deley, M.-C., Delattre, O., Schaefer, K.-L., Burchill, S.A., Koehler, G., Hogendoorn, P.C.W., Lion, T., Poremba, C., Marandet, J., Ballet, S., et al. (2010). Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1982–1988.

Leanza, L., Managò, A., Zoratti, M., Gulbins, E., and Szabo, I. (2016). Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: In vivo evidences. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 1385–1397.

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J.* 15, 1004–1011.

Lézot, F., Corre, I., Morice, S., Ré dini, F., and Verrecchia, F. (2020). SHH Signaling Pathway Drives Pediatric Bone Sarcoma Progression. *Cells* 9.

Li X, Me, M.-L., M, D., and Jj, W. (2010). The Ewing's sarcoma fusion protein, EWS-FLI, binds Runx2 and blocks osteoblast differentiation (*J Cell Biochem*).

Lin, P.P., Wang, Y., and Lozano, G. (2011). Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma* 2011.

Liu, X., Chang, Y., Reinhart, P.H., Sontheimer, H., and Chang, Y. (2002). Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1840–1849.

Loganathan, S.N., Tang, N., Fleming, J.T., Ma, Y., Guo, Y., Borinstein, S.C., Chiang, C., and Wang, J. (2016). BET bromodomain inhibitors suppress EWS-FLI1-dependent transcription and the IGF1 autocrine mechanism in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7, 43504–43517.

Lopatin, A.N., Makhina, E.N., and Nichols, C.G. (1995). The mechanism of inward rectification of potassium channels: “long-pore plugging” by cytoplasmic polyamines. *J. Gen. Physiol.* 106, 923–955.

Lopes, C.M.B., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J., and Logothetis, D.E. (2002). Alterations in Conserved Kir Channel-PIP2 Interactions Underlie Channelopathies. *Neuron* 34, 933–944.

Lu, Z., and MacKinnon, R. (1994). Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Nature* 371, 243–246.

Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 687–695.

MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232–235.

Mackintosh, C., Madoz-Gúrpide, J., Ordóñez, J.L., Osuna, D., and Herrero-Martín, D. (2010). The molecular pathogenesis of Ewing’s sarcoma.

Maire, G., Brown, C.W., Bayani, J., Pereira, C., Gravel, D.H., Bell, J.C., Zielenska, M., and Squire, J.A. (2008). Complex rearrangement of chromosomes 19, 21, and 22 in Ewing sarcoma involving a novel reciprocal inversion–insertion mechanism of EWS–ERG fusion gene formation: a case analysis and literature review. *Cancer Genet. Cytogenet.* 181, 81–92.

Marec-Bérard P, F, C., and L, C. (2010). [PNET/Ewing tumours: current treatments and future perspectives] (*Bull Cancer*).

Mavrogenis, A.F., Vottis, C.T., Megaloikonomos, P.D., Agrogiannis, G.D., and Theocharis, S. (2018). Neovascularization in Ewing’s sarcoma. *Neoplasma* 65, 317–325.

May Wa, Ml, G., Sl, L., Lb, L., Bc, L., O, D., J, Z., G, T., and Ct, D. (1993). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation (*Proc Natl Acad Sci U S A*).

McFerrin, M.B., Turner, K.L., Cuddapah, V.A., and Sontheimer, H. (2012). Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, C1070-1078.

Mu, D., Chen, L., Zhang, X., See, L.-H., Koch, C.M., Yen, C., Tong, J.J., Spiegel, L., Nguyen, K.C.Q., Servoss, A., et al. (2003). Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 3, 297–302.

Mullard, M., Cadé, M., Morice, S., Dupuy, M., Danieau, G., Amiaud, J., Renault, S., Lézot, F., Brion, R., Thepault, R.A., et al. (2020). Sonic Hedgehog Signature in Pediatric Primary Bone Tumors: Effects of the GLI Antagonist GANT61 on Ewing's Sarcoma Tumor Growth. *Cancers* 12.

Müllner, C., Steinecker, B., Gorischek, A., and Schreiber, W. (2009). Identification of the structural determinant responsible for the phosphorylation of G-protein activated potassium channel 1 by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS J.* 276, 6218–6226.

Murphey, M.D., Senchak, L.T., Mambalam, P.K., Logie, C.I., Klassen-Fischer, M.K., and Kransdorf, M.J. (2013). From the radiologic pathology archives: ewing sarcoma family of tumors: radiologic-pathologic correlation. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* 33, 803–831.

Navarro, S., González-Devesa, M., Ferrández-Izquierdo, A., Triche, T.J., and Llombart-Bosch, A. (1990). Scanning electron microscopic evidence for neural differentiation in Ewing's sarcoma cell lines. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 416, 383–391.

Nichols, C.G., and Lederer, W.J. (1991). Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.* 261, H1675-1686.

Ohno, T., Ouchida, M., Lee, L., Gatalica, Z., Rao, V.N., and Reddy, E.S. (1994). The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene* 9, 3087–3097.

Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* 237, 749–753.

Parihar, A.S., Coghlan, M.J., Gopalakrishnan, M., and Shieh, C.-C. (2003). Effects of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 471, 157–164.

Pillozzi, S., Brizzi, M.F., Balzi, M., Crociani, O., Cherubini, A., Guasti, L., Bartolozzi, B., Becchetti, A., Wanke, E., Bernabei, P.A., et al. (2002). HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* 16, 1791–1798.

Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.-L., LeGuennec, J.-Y., Bougnoux, P., and Vandier, C. (2006). Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2946–2953.

Potier, M., Tran, T.A., Chantome, A., Girault, A., Joulin, V., Bougnoux, P., Vandier, C., and Pierre, F. (2010). Altered SK3/KCa<sub>2.3</sub>-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 42–47.

Potikyan, G., France, K.A., Carlson, M.R.J., Dong, J., Nelson, S.F., and Denny, C.T. (2008). Genetically defined EWS/FLI1 model system suggests mesenchymal origin of Ewing's family tumors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 1291–1302.

Potratz, J., Dirksen, U., Jürgens, H., and Craft, A. (2012). Ewing Sarcoma: Clinical State-of-the-Art. *Pediatr. Hematol. Oncol.* *29*, 1–11.

Radons, J. (2014). Inflammatory stress and sarcomagenesis: a vicious interplay. *Cell Stress Chaperones* *19*, 1–13.

Rao, V.N., Ohno, T., Prasad, D.D., Bhattacharya, G., and Reddy, E.S. (1993). Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* *8*, 2167–2173.

Riggi, N., and Stamenkovic, I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett.* *254*, 1–10.

Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, M.-L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., and Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* *65*, 11459–11468.

Riggi, N., Suvà, M.-L., Suvà, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.-M., Stehle, J.-C., Baumer, K., Kindler, V., et al. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* *68*, 2176–2185.

Rodríguez-Galindo, C., Navid, F., Liu, T., Billups, C.A., Rao, B.N., and Krasin, M.J. (2008). Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *19*, 814–820.

Roman, D., Zhong, H., Yaklichkin, S., Chen, R., and Mardon, G. (2018). Conditional loss of Kcnj13 in the retinal pigment epithelium causes photoreceptor degeneration. *Exp. Eye Res.* *176*, 219–226.

Rorie, C.J., and Weissman, B.E. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res.* *64*, 7288–7295.

Salinas, M., de Weille, J., Guillemare, E., Lazdunski, M., and Hugnot, J.P. (1997). Modes of regulation of shab K<sup>+</sup> channel activity by the Kv8.1 subunit. *J. Biol. Chem.* *272*, 8774–8780.

Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 921–931.

Schirmer, L., Srivastava, R., Kalluri, S.R., Böttinger, S., Herwerth, M., Carassiti, D., Srivastava, B., Gempt, J., Schlegel, J., Kuhlmann, T., et al. (2014). Differential loss of KIR4.1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* *75*, 810–828.

Schulte, U., Hahn, H., Konrad, M., Jeck, N., Derst, C., Wild, K., Weidemann, S., Ruppertsberg, J.P., Fakler, B., and Ludwig, J. (1999). pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15298–15303.

Spyropoulos, D.D., Pharr, P.N., Lavenburg, K.R., Jackers, P., Papas, T.S., Ogawa, M., and Watson, D.K. (2000). Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5643–5652.

Stegen, B., Butz, L., Klumpp, L., Zips, D., Dittmann, K., Ruth, P., and Huber, S.M. (2015). Ca<sup>2+</sup>-Activated IK K<sup>+</sup> Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *13*, 1283–1295.

Stringer, B.K., Cooper, A.G., and Shepard, S.B. (2001). Overexpression of the G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer Res.* 61, 582–588.

Szuts, V., Ménesi, D., Varga-Orvos, Z., Zvara, Á., Houshmand, N., Bitay, M., Bogáts, G., Virág, L., Baczkó, I., Szalontai, B., et al. (2013). Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 648–656.

Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., and Heinemann, S.H. (2006). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and the von Hippel-Lindau protein. *J. Physiol.* 571, 349.

Teitell, M.A., Thompson, A.D., Sorensen, P.H., Shimada, H., Triche, T.J., and Denny, C.T. (1999). EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 79, 1535–1543.

Thurber, A.E., Nelson, M., Frost, C.L., Levin, M., Brackenbury, W.J., and Kaplan, D.L. (2017). IK channel activation increases tumor growth and induces differential behavioral responses in two breast epithelial cell lines. *Oncotarget* 8, 42382–42397.

Tinker, A., Aziz, Q., and Thomas, A. (2014). The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 171, 12–23.

Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. (2007). Mesenchymal Stem Cell Features of Ewing Tumors. *Cancer Cell* 11, 421–429.

Tirode, F., Surdez, D., Ma, X., Parker, M., Le Deley, M.C., Bahrami, A., Zhang, Z., Lapouble, E., Grossetête-Lalami, S., Rusch, M., et al. (2014). Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov.* 4, 1342–1353.

Toretzky Ja, V, E., A, L., Od, A., Jd, P., Tp, C., Am, R., Sb, L., and A, U. (2006). Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A (*Cancer Res*).

Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stühmer, W., and Pardo, L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369.

Vera, E., Cornejo, I., Niemeyer, M.I., Sepúlveda, F.V., and Cid, L.P. (2020). Altered phosphatidylinositol regulation of mutant inwardly rectifying K<sup>+</sup> Kir7.1 channels associated with inherited retinal degeneration disease. *J. Physiol.*

Volchenboum, S.L., Andrade, J., Huang, L., Barkauskas, D.A., Krailo, M., Womer, R.B., Ranft, A., Potratz, J., Dirksen, U., Triche, T.J., et al. (2015). Gene expression profiling of Ewing sarcoma tumours reveals the prognostic importance of tumour–stromal interactions: a report from the Children’s Oncology Group. *J. Pathol. Clin. Res.* 1, 83–94.

Weaver, A.K., Liu, X., and Sontheimer, H. (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 78, 224–234.



- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 463–472.
- Whelan, J., Le Deley, M.-C., Dirksen, U., Le Teuff, G., Brennan, B., Gaspar, N., Hawkins, D.S., Amler, S., Bauer, S., Bielack, S., et al. (2018). High-Dose Chemotherapy and Blood Autologous Stem-Cell Rescue Compared With Standard Chemotherapy in Localized High-Risk Ewing Sarcoma: Results of Euro-E.W.I.N.G.99 and Ewing-2008. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2018782516.
- Whorton, M.R., and MacKinnon, R. (2011). Crystal Structure of the Mammalian GIRK2 K<sup>+</sup> Channel and Gating Regulation by G Proteins, PIP2, and Sodium. *Cell* 147, 199–208.
- Willis, M., Leitner, I., Seppi, K., Trieb, M., Wietzorrek, G., Marksteiner, J., and Knaus, H.-G. (2018). Shaker-related voltage-gated potassium channels Kv1 in human hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 223, 2663–2671.
- Wojtovich, A.P., Sherman, T.A., Nadtochiy, S.M., Urciuoli, W.R., Brookes, P.S., and Nehrke, K. (2011). SLO-2 is cytoprotective and contributes to mitochondrial potassium transport. *PLoS One* 6, e28287.
- Xu, W., Liu, Y., Wang, S., McDonald, T., Van Eyk, J.E., Sidor, A., and O'Rourke, B. (2002). Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 298, 1029–1033.
- Zobel, C., Cho, H.C., Nguyen, T.-T., Pekhletski, R., Diaz, R.J., Wilson, G.J., and Backx, P.H. (2003). Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J. Physiol.* 550, 365–372.
- Zuo, J., Guo, W., Wang, S., Lang, Y., Wang, S., Shi, X., Zhang, R., Zhao, X., Han, Y., and Shao, L. (2020). Eight novel KCNJ1 variants and parathyroid hormone overaction or resistance in 5 probands with Bartter syndrome type 2. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 511, 248–254.

## **Abstract**

Ewing's sarcoma is the second most prevalent primary malignant bone tumour and mainly affects adolescents and young adults. Despite therapeutic progress, this tumour has a 5-year survival rate of 30% when metastases are detected at diagnosis. One of the main characteristics of these tumours lies in the presence of a chromosomal translocation, between a gene of the EWS family and a gene of the ETS family, giving in 85% a fusion gene coding for the EWS-FLI1 protein.

In this context we have investigated the expression of a calcium-activated potassium channel of low conductance, the SK1 channel. The potassium channels are transmembrane proteins ensuring the selective passage of K<sup>+</sup> ions through the phospholipid bilayer. They are a group of 70 members performing a large number of biological functions, some of which have been described as being involved in the tumorigenesis process.

In this work we were first interested in studying the expression of SK1 channel at the transcriptional and protein level in osteosarcoma and Ewing's sarcoma cell lines. We then studied the regulation of *KCNN1* by EWS-FLI1. Using reporter gene experiments, 5' deletions of the promoter but also chromatin immunoprecipitation, we were able to demonstrate the major role of the -1176 to -1005 region upstream of the initiation site in the regulation of *KCNN1* by EWS-FLI1. In addition, we were able to optimise the optimal experimental conditions of the "gel retardation " experiment to precisely identify the response element of the KCNN1 promoter to EWS-FLI1.

Furthermore, we have shown that in our first *in vitro* and *in vivo* experiments, *KCNN1* expression seems to play a role in the control of cell proliferation.

**Keywords :** Ewing's sarcoma – EWS-FLI1 - Calcium-activated potassium channels - SK1 – Promoter's study

# ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

## **Régulation de l'expression de *KCNN1* par EWS-FLI1 : rôle dans le développement du sarcome d'Ewing**

**Jérôme AMIAUD**

Diplôme Soutenu le 18 février 2021,

### **Résumé**

Le sarcome d'Ewing est la seconde tumeur osseuse primitive maligne en termes de prévalence et touche principalement l'adolescent et le jeune adulte. En dépit des progrès thérapeutiques cette tumeur présente un taux de survie à 5 ans de 30% lorsque des métastases sont présentes au diagnostique. Une des caractéristiques principales de ces tumeurs réside dans la présence d'une translocation chromosomique, entre un gène de la famille EWS et un gène de la famille ETS, donnant dans 85% un gène de fusion codant pour la protéine EWS-FLI1.

Dans ce contexte nous avons étudié l'expression d'un canal potassique activé par le calcium de faible conductance le canal SK1. Les canaux potassiques sont des protéines transmembranaires assurant le passage sélectif des ions K<sup>+</sup> à travers la bicouche phospholipidique. Il s'agit d'un groupe de 70 membres assurant un grand nombre de fonctions biologiques, et dont certains d'entre eux ont été décrits comme étant impliqués dans le processus de tumorigenèse.

Lors de ce travail nous nous sommes tout d'abord intéressés à étudier l'expression du canal SK1 au niveau transcriptionnel et protéique dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome et de sarcome d'Ewing. Nous avons ensuite étudié la régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1. A l'aide d'expérience de gènes rapporteur, de délétions en 5' du promoteur mais aussi d'immuno-précipitation de la chromatine, nous avons pu mettre en évidence le rôle majeur de la région -1176 à -1005 en amont du site d'initiation dans la régulation de *KCNN1* par EWS-FLI1. De plus nous avons pu optimiser les conditions expérimentales optimales d'expérience de « gel retard » pour identifier précisément l'élément de réponse du promoteur de *KCNN1* à EWS-FLI1.

Nous avons finalement mis en évidence dans nos premières expériences *in vitro* et *in vivo* que l'expression de *KCNN1* semble impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

**Mots clés :** Sarcome d'Ewing – EWS-FLI1 – Canaux potassiques activés par le calcium - SK1 – Etude de promoteur