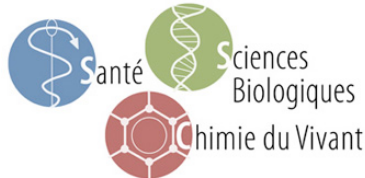




ECOLE DOCTORALE SSBCV



**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : [Christophe Vandier](#)

Unité : [Inserm UMR 1069](#)

Equipe (*si unité multi-équipes*):

Filière de rattachement : A

Email de l'encadrant : christophe.vandier@univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) : [Philippe Frank – Codirection](#)

2. Titre de la thèse : Régulation par le cholestérol du canal SK3 sensible aux éther-lipides.

3. Résumé :

Nous avons montré que le canal SK3 favorise la migration des cellules cancéreuses et le développement de métastases osseuses (Chantome et al., Cancer Res. 2013 Aug 1;73(15):4852-61). Plus précisément, lorsque la cellule cancéreuse exprime SK3, il se localise dans des nanodomains enrichis en cholestérol où il forme un complexe fonctionnel avec le canal calcique Orai1 responsable d'une entrée constitutive de calcium (Mignen et al. Eur Biophys J. 2017 Jul;46(5):395-413). En parallèle, nous avons démontré la capacité de certains éther-lipides et en particulier de l'Ohmline (1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose) à réduire le développement de métastases osseuses en ciblant spécifiquement le canal SK3 entraînant alors la dissociation du complexe SK3-Orai1, la diminution de l'entrée constitutive de calcium, de la migration cellulaire dépendante des calpines et du développement des métastases osseuses (Chantome et al., Cancer Res. 2013 Aug 1;73(15):4852-61). D'un point de vue mécanistique l'Ohmline s'intègre dans les membranes et dans les nanodomains enrichis en cholestérol, réduit les paramètres d'ordre de membranes artificielles (suggérant une augmentation de la fluidité membranaire) et déplace le groupement hydroxyl du cholestérol de ses principaux sites d'interaction (Herrera et al. ACS Omega, 2017, 2, 6361-6370).

L'objectif de ce projet de thèse est d'étudier précisément le rôle du cholestérol dans la régulation du canal SK3 et dans les effets de l'Ohmline ciblant le canal SK3. En effet, en plus de se localiser dans les nanodomains riches en cholestérol, nos données préliminaires montrent que le canal SK3 possède 36 séquences CRAC (Cholesterol Recognition/Interaction Amino acid Consensus sequence) ou CARC (séquence CRAC à orientation opposée) qui reconnaissent le cholestérol et la Methyl- β -cyclodextrine (M β CD), qui diminue le cholestérol, réduit l'activité de SK3. L'hypothèse de ce projet est que le cholestérol interagit avec SK3 via ses domaines CRAC et CARC, et régule l'activité de celui-ci en modulant la conformation de SK3. En conséquence, toute modification du métabolisme du cholestérol ou de l'interaction de SK3 avec le cholestérol sera associée avec une modification de l'activité du canal SK3.

Au cours de ce projet nous étudierons :

- **La régulation de l'activité du canal SK3 par le cholestérol.**
 - **Les mécanismes régulant l'interaction de l'Ohmline et du cholestérol et par conséquent l'activité de SK3.**
- Nous proposons dans un premier temps de moduler les niveaux de cholestérol cellulaire et d'examiner leurs effets sur l'activité du canal SK3. La M β CD (avec et sans cholestérol) nous permettra de modifier les concentrations de cholestérol membranaire. L'effet de la modulation de l'expression de protéines jouant un rôle dans le métabolisme et interagissant avec le cholestérol membranaire (caveoline-1, SR-BI, ABCA1, ABCG1) sera également étudiée.
- Nous allons également examiner l'effet de mutations des sites CRAC et CARC sur l'activité de SK3 et sa sensibilité au cholestérol en nous focalisant dans un premier temps sur le site CRAC situé à proximité du pore et pour lequel nous avons montré un rôle dans la sensibilité de SK3 à l'Ohmline.
- Des expériences de co-localisation entre SK3 et le cholestérol seront réalisées avec des analogues fluorescents du cholestérol. Dans ce cas, la spécificité de l'interaction du cholestérol avec SK3 pourra être examinée en présence d'analogues structuraux du cholestérol (ex : phytostérols) ou de protéines régulant le métabolisme du cholestérol. Toutes ces expériences seront également réalisées en présence d'Ohmline. De l'Ohmline fluorescente sera aussi utilisée pour des expériences de co-localisation entre Ohmline, le cholestérol et SK3.
- Comme il est connu que le cholestérol favorise le développement de tumeurs mammaires, nous proposons de traiter des souris (modèle PyMTTg ou modèle de xénogreffes) avec un régime enrichi en cholestérol et d'étudier l'effet de l'Ohmline sur le développement de tumeurs mammaires et de la formation de métastases.

Matériels et Méthodes : HEK-SK3 (et SK1, SK2, SK4 et BKCa pour la sélectivité vis-à-vis de SK3) et MDA-MB-435s/PC3/HCT116, patch-clamp, calcium, migration, expression de SK3 et transporteurs au cholestérol (RT-PCR et WB) et des partenaires calciques (Orai1, TRPC1, STIM1, TRPV2), Di4ANNEPPS et Laurdan (fluidité) et mesure du cholestérol (HTPLC/GC). Utilisation de lipoprotéine et de M β CD pour moduler le métabolisme de cholestérol. Microscopie de fluorescence.

4. Résumé en anglais :

Regulation of the ether-lipids sensitive SK3 channel by cholesterol

We have shown that the SK3 channel promotes the migration of cancer cells and the development of bone metastases (Chantome et al., *Cancer Res* 2013 Aug 1; 73 (15): 4852-61). More specifically, when cancer cells express SK3, it is localized in cholesterol-enriched nanodomains, where it forms a functional complex with the calcium channel Orai1 that is responsible for a constitutive calcium entry (Mignen et al., *Eur Biophys J.* 2017 Jul; 46 (5): 395-413). In parallel, we have demonstrated the ability of certain ether-lipids and in particular Ohmlin (1-O-hexadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-lactose) to reduce the development of bone metastases by specifically targeting the SK3 channel. The resulting effect is the dissociation of the SK3-Orai1 complex, a decreased constitutive calcium entry, calpain-dependent cell migration, and the development of bone metastases (Chantome et al., *Cancer Res* 2013 Aug 1; 73 (15): 4852-61). From a mechanistic point of view, Ohmlin integrates into membranes and cholesterol-enriched nanodomains, reduces the order parameters of artificial membranes (suggesting an increase in membrane fluidity), and displaces the hydroxyl group of cholesterol from its main interaction sites (Herrera et al., *ACS Omega*, 2017, 2, 6361-6370).

The aim of this thesis project is to more precisely determine the role of cholesterol in the regulation of the SK3 channel activity and in the effects of the Ohmlin targeting the SK3 channel. In addition to locating in cholesterol-enriched nanodomains, our preliminary data show that the SK3 channel has 36 CRAC (Cholesterol Recognition / Interaction Amino Acid Consensus Sequence) or CARC (CRAC Opposite Sequence) sequences that recognize cholesterol and Methyl- β -cyclodextrin (M β CD), that decreases cholesterol, reduces SK3 activity. The hypothesis of this project is that cholesterol interacts with SK3 via its CRAC and CARC domains, thereby regulates SK3 activity by modulating SK3 conformation. As a result, any changes in cholesterol metabolism or SK3 interaction with cholesterol will be associated with a change in SK3 channel activity.

During this project we will study:

- **The regulation of the SK3 channel activity by cholesterol.**
- **The mechanisms regulating the interaction between Ohmlin and cholesterol and consequently the activity of SK3.**

For this part, we will examine the mechanism by which cholesterol regulates the SK3 channel activity.

- In this case, we will first modulate the levels of cellular cholesterol and examine the effect on the SK3 channel activity: M β CD (with and without cholesterol) will allow us to modify membrane cholesterol levels. We will also modulate the expression of proteins that play a role in the metabolism and interact with membrane cholesterol (caveolin-1, SR-BI, ABCA1, ABCG1) will also be used.
- We will examine the effect of CRAC and CARC specific mutations on SK3 and its sensitivity to cholesterol.
- Co-localization experiments between SK3 and cholesterol will be performed with fluorescent analogs of cholesterol. In that case, the specificity of the interaction between cholesterol and SK3 will be examined in presence of structural analogues of cholesterol (e.g., phytosterols) or proteins regulating cholesterol metabolism. Unlike cholesterol, phytosterols inhibit tumor growth. All these experiments will also be performed in the presence of Ohmlin. Moreover, fluorescent Ohmlin will be used for co-localization experiments between Ohmlin, cholesterol and SK3.

- As it is well-known that cholesterol promotes the development of mammary tumors, we propose to treat mice (model PyMTTg or model of xenografts) with a cholesterol-enriched diet and to study the effects of Ohmlin on the development of mammary tumors and the formation of metastases *in vivo*.