



**HAL**  
open science

# Implication du transporteur au magnésium MAGT1 dans le développement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Pierre Rybarczyk

► **To cite this version:**

Pierre Rybarczyk. Implication du transporteur au magnésium MAGT1 dans le développement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. 2021. dumas-03533172

**HAL Id: dumas-03533172**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03533172v1>**

Submitted on 18 Jan 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Picardie Jules Verne**

U.F.R. DE MEDECINE

Année 2021

Thèse N° 2021-177

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
MEDECINE

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

**IMPLICATION DU TRANSPORTEUR AU  
MAGNESIUM MAGT1 DANS LE  
DEVELOPPEMENT DE L'ADENOCARCINOME  
CANALAIRE PANCREATIQUE**

Présentée et soutenue publiquement le 12 Octobre 2021

Par **Pierre RYBARCZYK**

Né le 22 Novembre 1986

**Jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Charles SABBAGH

Monsieur le Professeur Mathieu GAUTIER

**Directeur de thèse :** Monsieur le Professeur Denis CHATELAIN

## REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE  
Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à l'UFR de Médecine d'Amiens  
Adjoint au chef de l'Oncopôle

*Monsieur Sevestre, avec l'honneur que vous me faites de présider mon jury de thèse j'ai un sentiment de « boucle-bouclée ». Vous présidiez déjà mon jury de thèse de Science et déjà à l'époque, vous évoquiez le fait que cette situation se produirait. Je tenais à vous remercier pour votre accueil durant toutes ces années au sein de votre service. Merci pour votre formation, vos conseils et votre gentillesse durant ma formation d'interne, j'ai beaucoup appris à vos côtés.*

A, Monsieur le Professeur Charles SABBAGH  
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
(Chirurgie digestive)

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.*

A, Monsieur le Professeur Mathieu GAUTIER  
Professeur des Universités au Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire  
UPJV AMIENS

*Merci d'avoir accepté de prendre part à mon jury et de juger ce travail. Tu es présent à mes cotés depuis le début de mon cursus universitaire en licence biologie. Tu as ensuite dirigé ma thèse de Science d'une main de maître et tu m'as soutenu dans mes choix difficiles à la fin de cette période. Notre collaboration scientifique depuis est pour moi un réel honneur, ton amitié sincère également.*

A, Monsieur le Professeur Denis CHATELAIN  
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
(Anatomie et cytologie pathologique)  
Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU d'Amiens Picardie

*Denis, merci d'avoir dirigé ce travail de thèse. Je tenais à te remercier pour l'ensemble de tes enseignements depuis notre rencontre qui remonte à mon Master 2 en 2011. Ta rigueur diagnostique et scientifique ainsi que ta gentillesse sont pour moi des exemples. Merci également d'avoir su entretenir et perpétuer cette ambiance qui fait de ce service un endroit convivial où travailler est agréable.*

A ma famille :

Marion, te rencontrer est la plus belle chose qui me soit arrivé. En écrivant ces dernières lignes, je me rends compte de ton importance dans ma vie, sans toi rien n'aurait été possible. Ton soutien et ton amour à la reprise de mes études, au décès de mon père et dans les moments plus moroses ou de joie de notre vie sont pour moi un moteur. L'arrivée de nos enfants Faustine et Juliette dans notre famille est un bonheur sans limite !! Je t'aime.

A mes deux puces, Faustine et Juliette, pour quand vous serez en âge de lire ces lignes, je vous aime.

Merci à ma grand-mère Ghislaine et ma tante Corinne pour leur soutien et leur amour inconditionnel.

Maman, merci pour tout ce que tu m'as apporté dans la vie. J'ai pu compter sur ton soutien au cours de ces longues études voire très longues. Nos discussions dans les moments de doute m'ont souvent permis de me recentrer sur l'essentiel. Merci également pour ton rôle de « super mamie » que tu incarnes à la perfection.

François, Audrey, même si vous êtes à l'autre bout de la France, au soleil, nos appels réguliers et vos visites régulières sont toujours des moments de retrouvailles intenses avec une bonne dose de rigolade.

Francine, Jean-phi, Fanny, Olivier, Hugo et Elisa, merci d'être présents, vous êtes une vraiment « belle » famille, en tous cas la seconde pour moi sans aucun doute.

Au service d'anatomie et cytologie pathologiques :

Au docteur Carole Cordonnier, bénéficiaire de votre enseignement de la pathologie rénale restera un moment fort de ma formation. Merci pour tous vos conseils et votre pédagogie.

Au Docteur Jean-Fortuné Ikoli, merci pour vos apprentissages notamment durant mes premières années lors des séances d'extempo hebdomadaires, toujours dans la bonne humeur.

A Christophe, même si je n'ai pas encore eu l'occasion de faire la dermatopathologie avec toi, corriger des cas ensemble est toujours un plaisir et une réelle source d'apprentissage. Merci pour ta disponibilité, ton pragmatisme et ta gentillesse.

A Nelly ancienne co-interne et maintenant « chef », ta gentillesse, ton humeur et ta bonne humeur rendent les longues séances de correction facile à vivre. Ces qualités font de toi aussi une personne que je suis content d'avoir comme amie.

A Jean René, tu es l'un des premiers avec qui j'ai sympathisé, (est ce une chance ?). Merci pour tous ces moments de plaisanterie et d'entraide dans le fameux « bureau à fleurs ». Depuis le début de ton assistanat, tu as également réussi à conserver cette ambiance au cours des séances de correction (sauf pendant les séances de lames en visio) qui font que travailler sous ta gouverne est un réel plaisir.

A mes co-internes de promotion, Amine et Robin : merci pour ces quatre années où l'entraide et l'entente entre nous étaient au top, j'en mesure la chance.

A mes autres co-internes : Benjamin pour les discussions « jardinage » ; Arnaud pour les veillées nocturnes ; Quentin pour ton humour décalé ; Clémence pour ton humour un peu moins décalé et ta capacité à supporter Quentin. Axel pour avoir fleuri mon bureau pendant 6 mois ; Marion pour ta bonne humeur ; Guillaume pour tes punch-lines ; Amel et Ahmed pour votre sympathie.

Aux membres du service du CHU : Louis-Victor et Richard pour nos discussions sur le bricolage et autres lors des SUD. Aux techniciens souvent en macro, Mahé, Mathieu, Ahmed, Morgan merci de supporter mon débit de parole, mes blagues et mes chansons. Merci à Marie-Pierre pour ton aide précieuse en immunohistochimie. Merci à Chloé, Cathy, Valentine, Elise, Elodie, Christine, Florine, Sylvie, Hélène, Valérie, Catherine, Sophie, Riad pour votre bonne humeur et votre sympathie. Merci à Isabelle et Dominique, les premiers bonjours du matin toujours avec un grand sourire. D'une manière plus globale un grand merci à tous de faire que cet internat se passe si bien.

Aux anciens du service : Lewis, Guillaume, Alexandra, Estelle, Clémence votre passage restera gravé dans ma mémoire, notre amitié aussi. Alexandra, merci pour ta bonne humeur et ta patience pour mes débuts en néphrologie, Estelle, en fait c'est un faux-départ tu es encore-la c'est top.

Aux membres du service de biologie moléculaire pour leur accueil et leur aide. Merci au Dr Julie Dremaux pour son soutien technique. Merci à Jérôme, ton aide et ton amitié sont précieuses.

Merci aux docteurs Thomas Petit, Claire Delattre pour vos enseignements mais aussi aux docteurs Céline Bertocchi, Philippe Camparo et Pascal Richard pour leur accueil durant mon semestre au sein du cabinet i-Path. Ce fut une expérience très enrichissante avec la découverte d'une autre facette du même métier. Votre disponibilité, accessibilité et sympathie m'ont marqué.

*A mon père,*

Je tenais également à te dédier ce travail, tu es parti beaucoup trop tôt. C'est de toi que je tiens cette passion pour la recherche avec les journées labo de mon enfance. Tu m'as ensuite accompagné durant mon parcours en Sciences et tout de suite compris que ma réorientation en médecine était une étape nécessaire. J'aurais tellement aimé que tu sois présent à cette soutenance mais le cancer du pancréas en a décidé autrement. Depuis j'essaie de progresser et de m'améliorer chaque jour dans ma vie personnelle et professionnelle en pensant à toi et ce que tu aurais fait.

## SOMMAIRE

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>MATERIELS ET METHODES</b> .....   | <b>11</b> |
| 2.1      | Analyse du Tissue Cancer Genome Atlas (TCGA).....  | 11        |
| 2.2      | Critères d'inclusion patients .....  | 11        |
| 2.3      | Expression immunohistochimique de MAGT1.....   | 12        |
| 2.4      | Extraction d'ARN à partir de blocs FFPE.....   | 13        |
| 2.5      | Culture cellulaire.....  | 13        |
| 2.6      | Inhibition de MAGT1 par technique siRNA.....   | 14        |
| 2.7      | Etude du potentiel migratoire et invasif .....   | 15        |
| 2.8      | Mesure de la viabilité cellulaire : Test au MTT .....  | 17        |
| 2.9      | Analyse par PCR en temps réel.....   | 17        |
| 2.10     | Analyses statistiques : .....  | 18        |
| <b>3</b> | <b>RESULTATS</b> .....   | <b>19</b> |
| 3.1      | Expression des différents transporteurs au magnésium à partir des données du TCGA et de Protein Atlas..... | 19        |
| 3.2      | Caractéristiques des patients de l'étude. ....   | 21        |
| 3.3      | Etude immunohistochimique de l'expression de MAGT1 : .....   | 22        |
| 3.4      | Extraction d'ARN à partir de tissus inclus en paraffine.....   | 26        |
| 3.5      | Quantification des transcrits de MAGT1 par qRT-PCR après transcription par siRNA des cellules PANC-1.....  | 27        |
| 3.6      | Implication de MAGT1 dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires.                           | 28        |
| <b>4</b> | <b>Discussion</b> :.....   | <b>31</b> |
| 4.1      | Expression de MAGT1 dans les tissus d'adénocarcinomes pancréatiques :.....                                 | 31        |
| 4.2      | Extraction d'ARN sur fragments tissulaires fixé en paraffine.....  | 32        |
| 4.3      | Effets physiopathologiques de MAGT1 dans la lignée PANC-1.....   | 33        |
| <b>5</b> | <b>Conclusion</b> : .....  | <b>35</b> |
| <b>6</b> | <b>Bibliographie</b> : .....   | <b>36</b> |
| <b>7</b> | <b>ANNEXE</b> :.....   | <b>39</b> |
| 7.1      | Séquences des siRNA utilisées:.....  | 39        |
| 7.2      | Séquences des amorces de PCR utilisées : .....   | 39        |

# **1 INTRODUCTION**

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (ACP) est un cancer redoutable avec un taux de survie nette à 5 ans de 9% (données Institut National du Cancer, 2018). Le mauvais pronostic de l'ACP est dû à sa détection souvent tardive associée à un fort potentiel métastatique et une importante chimiorésistance. Actuellement, malgré le progrès des traitements, le seul moyen d'améliorer la survie des patients reste la chirurgie à visée curative réalisable pour environ 20% des cas. Enfin, les projections récentes indiquent que ce cancer, actuellement la 4<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde, deviendra le 2<sup>ème</sup> cancer le plus meurtrier en 2030 (Rahib et al., 2014). L'ACP constitue donc un problème majeur de Santé Publique pour lequel il est important de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent sa progression. Certains facteurs de risque de l'ACP relativement généraux ont été identifiés : il s'agit notamment du tabac, de l'alcool, de l'obésité, du diabète, des prédispositions génétiques (~2 à 10% des ACP) et de la pancréatite chronique (Hu et al., 2021). Il est également suspecté que l'augmentation du risque d'ACP soit liée aux changements des habitudes alimentaires de la population dont, entre autres, la consommation de magnésium ( $Mg^{2+}$ ).

En effet, il a été observé récemment que la consommation de  $Mg^{2+}$  était inférieure aux recommandations nutritionnelles (380 mg/j chez l'homme et 300 mg/j chez la femme, ANSES) pour environ la moitié de la population des Etats-Unis, dû principalement aux procédés industriels qui détruisent 80 à 90% du  $Mg^{2+}$  des matières premières alimentaires, à la diminution de la consommation de fruits et légumes, à l'alimentation rapide (fast-food) mais aussi à l'appauvrissement de la teneur en sels minéraux des sols qui a provoqué la diminution de 20 à 30% de la quantité de  $Mg^{2+}$  dans les fruits et légumes au cours des 60 dernières années (Costello et al., 2016), (Worthington, 2001). Or, des études épidémiologiques récentes montrent une relation inverse entre la consommation de  $Mg^{2+}$  et le risque de développer certains cancers dont l'ACP. En effet, une diminution de la consommation de  $Mg^{2+}$  de 100 mg par jour est corrélée à une augmentation de 24% de l'incidence de l'ACP suggérant ainsi que la consommation de  $Mg^{2+}$  pourrait être bénéfique dans le cadre de la prévention primaire de l'ACP (Dibaba et al., 2015).

A l'inverse, des études sur lignées cellulaires montrent que les cellules cancéreuses contiennent plus de  $Mg^{2+}$ , ce qui leur confère un avantage métabolique et stimule leur

prolifération. L'utilisation de modèles *in vivo* montre que la diminution de  $Mg^{2+}$  dans l'alimentation réduit la taille de la tumeur primaire chez des souris développant des cancers du poumon, du sein ou du colon alors que la réintroduction de  $Mg^{2+}$  stimule la croissance tumorale. Cependant, les souris atteintes d'hypomagnésémie développent plus de métastases pulmonaires que les animaux contrôles. La littérature scientifique suggère qu'un déficit en  $Mg^{2+}$  pourrait être à l'origine de l'initiation de la transformation cancéreuse et de la formation des métastases alors que la croissance de la tumeur primaire serait quant à elle stimulée par la consommation de  $Mg^{2+}$  (Castiglioni and Maier, 2011)

Le  $Mg^{2+}$  est le cation divalent le plus présent au sein des cellules de l'organisme. Son rôle physiologique est primordial, en effet c'est le cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques. Il est également impliqué dans la synthèse protéique et dans celle des acides nucléiques ainsi que dans leur stabilisation (Dominguez et al., 2021). Son homéostasie cellulaire est régulée par la présence de transporteurs se situant au niveau de la membrane plasmique ou mitochondriale. Les deux transporteurs les plus étudiés sont les canaux TRPM7 et TRPM6 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7/6). Ces deux canaux se situent à la membrane plasmique des cellules de manière ubiquitaire pour TRPM7 et majoritairement au niveau rénal et colique pour TRPM6 (de Baaij, 2015). Ils sont tous deux, catégorisés comme canaux cationiques non-sélectifs laissant entrer dans la cellule de nombreux cations divalents dont le  $Mg^{2+}$ . De plus, ils présentent tous deux un domaine kinase à leur extrémité C-Terminale et peuvent former des hétérotétramères (Nadler et al., 2001; Schlingmann et al., 2007). Le transporteur mitochondrial MRS2 (Mitochondrial RNA Splicing 2) est le premier des transporteurs au  $Mg^{2+}$  caractérisé de manière moléculaire. Il est impliqué dans l'influx intra-mitochondrial de  $Mg^{2+}$  et participe donc par cet effet au métabolisme cellulaire (Bui et al., 1999). Le Transporteur SLC41A1 (Solute Carrier family 41, member 1) est un échangeur cytoplasmique qui permettrait un efflux de  $Mg^{2+}$  dépendant d'un influx de  $Na^+$  (Kolisek et al., 2012). La famille des transporteurs CNNM (Cyclin M family) est composée de 4 protéines, CNNM1-4, les plus étudiées sont CNNM2 et 4. A l'heure actuelle, leur fonction de transporteurs permettant une régulation directe du  $Mg^{2+}$  intracellulaire n'est pas bien définie (Schäffers et al., 2018). Finalement le transporteur MAGT1 (Magnesium Transporteur 1) a été identifié par sa capacité à être surexprimé en cas d'hypomagnésémie (Goytain and Quamme, 2005). Une publication démontre un transport du  $Mg^{2+}$  voltage-dépendant à l'instar d'un canal ionique dans le cadre de sa surexpression dans des ovocytes de xénope (Goytain and Quamme, 2005). Chez l'humain le fonctionnement de

cette protéine reste à définir, en effet, certaines études ont commencé à mettre en évidence le rôle de MAGT1 dans un complexe de glycosylation au sein du réticulum endoplasmique et pourrait donc suggérer un rôle secondaire *via* un impact sur l'adressage et la stabilisation à la membrane plasmique d'autres transporteurs aux  $Mg^{2+}$  (Shrimal et al., 2015).

Dans l'ACP, l'exploration du rôle physiopathologique de ces différents transporteurs est restreinte à l'étude du canal TRPM7, notamment par notre équipe, avec la mise en évidence de son rôle dans les mécanismes de migration et d'invasion cellulaires (Rybarczyk et al., 2012, 2017). Une autre étude a permis la mise en évidence du rôle de SLC41A1 dans la prolifération et l'établissement des métastases dans des modèles orthoptiques d'ACP (Xie et al., 2019).

En résumé, la consommation de  $Mg^{2+}$  semble clairement associée avec le risque de cancer et notamment de l'ACP et les homéostasies tissulaire et cellulaire du  $Mg^{2+}$  semblent fortement altérées en fonction de la progression du cancer. Ainsi, il serait particulièrement intéressant d'approfondir l'étude de l'expression de ces transporteurs au  $Mg^{2+}$  ainsi que leur(s) rôle(s) dans la progression de l'ACP.

#### **Objectifs du travail :**

- 1. Déterminer le profil d'expression des différents transporteurs au  $Mg^{2+}$  au sein de la cohorte d'adénocarcinome pancréatique du TCGA et sélectionner une cible d'intérêt.**
- 2. Déterminer au sein d'une cohorte de patient du CHU Amiens Picardie, l'expression de ce transporteur d'intérêt dans les tissus tumoraux d'ACP.**
- 3. Evaluer le rôle de ce transporteur dans les processus physiopathologiques de l'ACP.**

## **2 MATERIELS ET METHODES**

### **2.1 Analyse du Tissue Cancer Genome Atlas (TCGA)**

L'analyse de l'expression des principaux transporteurs au magnésium a été réalisée à l'aide du site GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn>). Ce site permet, pour chaque transporteur, l'analyse de l'expression des transcrits (ARNm) en compilant les données issues de la cohorte PAAD (PANcreatic ADenocarcinoma) (Raphael et al., 2017) issue du TCGA (Tissue Cancer Genomic Atlas) à celle du GTEx (Genome Tissue Expression). Le profil d'expression d'échantillons tumoraux *versus* non-tumoraux a été ainsi comparé. Afin de déterminer une possible corrélation d'expression entre certains transporteurs, une analyse statistique en composante principale a été réalisée en analysant les données d'expression du TCGA (cohorte PAAD) à l'aide du site c-bioportal (<https://www.cbioportal.org>) et du logiciel R pour l'étude statistique. Cette analyse a été réalisée avec l'aide du Dr. Nicolas Jonckheere (UMR 9020-U1277, Université de Lille) et de Melle Julie Auwerx (Doctorante, UR-UPJV 4667). Finalement, La corrélation de l'expression de notre transporteur d'intérêt à la survie des patients a également été réalisée par le biais de GEPIA2 selon un test logrank.

Les données d'expression en immunohistochimie préliminaires à ce travail ont été obtenues par le biais du site Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) mettant à disposition le résultat d'immunomarquage anti-MAGT1 dans neuf tissus tumoraux pancréatiques. L'anticorps HPA049851 (Sigma) dirigé contre MAGT1 est celui utilisé pour les lames mises à disposition suivant les critères de validation du site.

### **2.2 Critères d'inclusion patients**

Pour cette étude, les patients inclus, sont des patients opérés à visée curative d'un ACP au CHU Amiens Picardie, au sein du service de chirurgie digestive du Pr. J.M. Regimbeau. La période d'inclusion pour cette étude s'étend de Janvier 2019 à Août 2021, ce délai de deux ans a été préféré afin de garantir la meilleure qualité possible pour la technique d'extraction d'ARN sur fragment fixé en paraffine. Les paramètres recueillis sont tout d'abord très généraux avec : le sexe, l'âge au moment de la chirurgie. Puis les paramètres anatomopathologiques déterminés lors de la prise en charge de la pièce opératoire ont ensuite été recueillis. Ces derniers sont : le grade histologique classé en trois catégories, G1 pour les

tumeurs bien différenciées, G2 pour les tumeurs modérément différenciées et G3 pour les tumeurs peu différenciées. La taille a ensuite été recueillie avec trois catégories également, T1 (taille  $\leq 2$ cm), T2 ( $2 < \text{Tumeur} \leq 4$ cm) et T3 ( $\text{Tumeur} \geq 4$ cm). Le statut métastatique au niveau ganglionnaire a été recueilli en trois catégories : N0, absence de métastases ganglionnaires ; N1, 1 à 3 ganglions envahis ; N2, 4 ganglions ou plus d'envahis. La présence de métastases à distance a été recherchée et classée en 2 catégories : M0, absence de métastase ; M1, présence. Puis la présence ou non d'engainement peri-nerveux (EPN+/-), d'invasion vasculaire (IV+/-) et la qualité de la résection (R0, R1) ont finalement été recueillis.

### **2.3 Expression immunohistochimique de MAGT1**

Les échantillons de tissus pancréatiques tumoraux et non-tumoraux ont été obtenus à partir de pièces de duodéno-pancréatectomies céphaliques ou de spléno-pancréatectomies analysées au sein du service d'anatomie et de cytologie pathologiques du CHU Amiens-Picardie dirigé par le Pr. D. Chatelain. Le bloc contenant l'échantillon tissulaire fixé en formol et inclus en paraffine a été sélectionné, avec comme critère la présence sur la lame d'observation de tissu tumoral et non-tumoral (contrôle négatif interne).

Les blocs ont ensuite été « techniqués » par le biais du processus classique d'analyse par immunohistochimie. Des coupes de 2 à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées et déposées sur une plaque chauffée à 75°C afin de déparaffiner la lame. Ensuite les lames sont placées dans un automate (Ventana, Tucson, USA) où elles subissent un pré-traitement au « cell conditioner » 1, pH 9, pendant 64 minutes. L'anticorps primaire dirigé contre MAGT1 (HPA049851, Sigma) est ensuite incubé pendant 32 minutes à une dilution de 1/50 et l'anticorps secondaire (cell signalling) pendant 8 minutes. La révélation a été réalisée à l'aide du kit OptiView DAB ICH (Roche diagnosis). La dernière étape consiste en une contre-coloration à l'hématoxyline pendant 4 minutes. La lame ainsi préparée est rincée puis montée sous lamelle. Une phase test a également été réalisée avec un second anticorps anti-MAGT1 (ANT-197 Alomone). Cette phase a consisté au test pour les deux anticorps de multiples dilutions s'échelonnant du 1/20 au 1/150 associé à différents types de prétraitement et de l'utilisation ou non du kit de révélation optiview.

Une double lecture des lames a été effectuée en présence du Pr. D. Chatelain. Les tissus pancréatiques tumoraux sont hétérogènes. L'analyse de ce type de tissu demande donc une méthode de « scoring » particulière. Tout d'abord, un score entre 1 et 3 est attribué en

fonction du marquage (1 = faible et 3 = fort) pour chaque lame. Puis, un pourcentage par intensité de marquage retrouvé sur la lame est déterminé. Les différentes intensités ont été multipliées par leurs pourcentages respectifs, puis ensuite additionnées pour donner un score final sous la forme d'une variable quantitative continue s'étalant théoriquement de 0 à 3 (Rybarczyk et al., 2012).

## **2.4 Extraction d'ARN à partir de blocs FFPE**

Pour cette étape, une technique d'extraction automatisée utilisant un automate permettant l'extraction d'ADN et/ou d'ARN sur tissus inclus en paraffine est réalisée. Pour réaliser cette méthode, des copeaux d'une épaisseur de 10µm sont réalisés pour chaque bloc de tissu tumoral ou sain. Trois copeaux sont ensuite placés au sein de l'automate qui effectue l'ensemble du processus d'extraction de manière automatisée. L'éluat obtenu est ensuite dosé en utilisant une technique de fluorimétrie utilisant le kit qubit RNA BR associé au fluorimètre Qubit (Invitrogen).

Finalement, la qualité des ARN obtenus a été testée à l'aide du bioanalyseur 2100 d'Agilent. Cette technique permet la réalisation d'une électrophorèse automatisée avec une faible consommation de matériel. En effet, l'utilisation du kit Bioanalyser RNA 6000 nano, Agilent a permis par l'intégration d'un fluorochrome à l'ARN et ensuite par sa migration au travers de la puce spécifique fournie au sein du kit de déterminer la qualité de nos ARN. Cette qualité est représentée par le RIN (RNA Integrity Number) qui a été déterminé pour chaque échantillon par le biais du logiciel intégré à l'automate. Le RIN, dont l'unité est arbitraire, s'échelonne de 10 pour de l'ARN intact à 2 pour de l'ARN dégradé.

## **2.5 Culture cellulaire**

Pour ce travail, la lignée PANC-1 a été utilisée. Celle-ci provient de L'American Tissue Culture Collection (ATCC). Elle a été isolée à partir d'une tumeur de la tête du pancréas chez un homme de 56 ans, chez qui des métastases ont été détectées. La lignée PANC-1 fait partie des lignées peu différenciées (Deer et al., 2010) et peut donc s'apparenter à un cancer de grade III (Sipos et al., 2003).

Toutes les manipulations nécessaires à la culture des cellules sont réalisées dans une salle dédiée à la culture cellulaire, sous un poste de sécurité microbiologique de type II (Faster BH-EN-2003-S) pour minimiser au maximum le risque de contamination. Les cellules sont tout d'abord décongelées suivant une procédure standard recommandée par l'ATCC. Cela consiste à incuber l'ampoule contenant les cellules congelées à 37°C jusqu'à sa décongélation totale puis les cellules dans leur milieu de congélation (Sérum de Veau Fœtal (SVF) + DMSO 10%) sont resuspendues dans un flacon de culture 25 cm<sup>2</sup> contenant 6 ml de milieu de culture. Le milieu de culture des cellules PANC-1 est constitué de DMEM (Sigma) additionné de SVF décomplémenté (10%, Lonza). Le milieu de culture sera renouvelé après 24h afin d'éliminer l'ensemble du DMSO, solvant pouvant, à forte concentration, être toxique pour les cellules. Il sera ensuite renouvelé de manière classique toutes les 48h.

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire de 25 ou de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc) traités pour favoriser l'adhésion des cellules au support. Les cellules sont conservées dans un incubateur dans lequel est maintenue une atmosphère à 37°C, saturée en humidité et contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Afin d'éviter le phénomène d'inhibition de contact, les cellules doivent être décollées par l'action de la trypsine lorsque la confluence à l'intérieur du flacon de culture atteint environ 80%. Après l'élimination du milieu de culture, les cellules sont décollées par l'ajout de la trypsine EDTA (0,5g/L, Invitrogen). La trypsine est une enzyme protéolytique qui, en association avec l'EDTA (un chélateur du calcium), va entraîner la déstructuration des protéines d'adhésion membranaire. Son action est ensuite neutralisée par l'ajout du milieu de culture. Après homogénéisation mécanique des cellules en suspension, 20 µL du milieu est déposé sur une cellule de Malassez afin d'estimer le nombre de cellules présentes dans le flacon de culture. Le nombre de cellules à resuspendre pour réaliser les expériences est calculé. Chaque décollement-resuspension correspond à un cycle appelé « passage ». Pour éviter une trop grande dérive phénotypique due à une pression de sélection par dilution, les cellules, ne sont conservées en culture qu'une trentaine de passages puis une nouvelle ampoule est décongelée.

## **2.6 Inhibition de MAGT1 par technique siRNA**

Le principe des petits ARN interférents (siRNA pour small interfering RNA) est d'entraîner la destruction d'un ARNm cible afin d'empêcher l'expression de la protéine d'intérêt. Techniquement, cela consiste à faire pénétrer dans la cellule un ARN double brin de

petite taille (environ 20 pb) appelé siRNA qui sera capté par le complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing *Complex*). Ce complexe va permettre de dissocier le double brin et de guider le brin anti-sens vers son ARNm cible complémentaire. Le siRNA fixé à son ARNm cible va entraîner par une parfaite homologie de séquence une destruction de ce double brin par les protéines argonautes. Ces protéines assurent la fonction catalytique du complexe RISC et seront à l'origine de la dégradation de l'ARNm. Cette destruction réduisant fortement l'expression de la protéine cible.

Au cours de ce travail, les transfections transitoires ont été effectuées par nucléofection. Cette technique consiste, à l'aide d'un appareil (nucleofector 2D, Amaxa, lonza), à créer un arc électrique rendant la membrane plasmique perméable pendant un temps très court. Pour réaliser cette technique, des tampons de nucléofection spécifiques aux lignées cellulaires sont nécessaires (nucleofector kit R, Amaxa). Après décollement, 1 million de cellules sont récupérées pour chaque condition. Deux conditions sont nécessaires : une utilisant un siRNA contrôle ne touchant aucune séquence d'ARNm connue, et l'autre utilisant le siRNA ciblant les ARNm codant pour MAGT1 (les séquences nucléotidiques utilisées sont disponibles en annexe). Ces cellules sont centrifugées puis le culot est repris dans 100  $\mu$ L de tampon de nucléofection auquel on ajoute 2  $\mu$ g de siRNA (contrôle ou cible, Eurogentec). Les cellules sont ensuite électroporées avec le programme X-005 PANC-1. Enfin, les cellules sontensemencées selon les besoins de l'expérience dans leurs milieux respectifs.

## **2.7 Étude du potentiel migratoire et invasif**

Afin d'évaluer l'impact de MAGT1 sur les capacités migratoire et invasive de la lignée PANC-1, les cellules sont transférées dans un système de chambres de Boyden. Pour ce faire, nous avons utilisé des inserts Becton Dickinson (BD353097, France) dont la partie inférieure est constituée d'une membrane de polyéthylène-téréphtalate criblée de pores d'environ 8  $\mu$ M de diamètre. Ces pores sont d'une taille inférieure à celle des cellules cancéreuses afin que la migration des cellules à travers la membrane se fasse activement et non pas par effet gravitationnel. Ces inserts sont disposés dans une plaque de culture 24 puits (Falcon 353047), ce dispositif permet la création de deux compartiments.

Le compartiment supérieur contenant l'insert accueillera les cellules diluées dans 200  $\mu$ l de milieu de culture. Le compartiment inférieur formé par le puit de la plaque de culture contient 800  $\mu$ L de milieu de culture. Deux types de migration ont ensuite été évaluées, la

première, dite basale, avec la même proportion de SVF dans les deux compartiments (10 %). La seconde est induite par un chimiotactisme généré par un gradient de SVF entre le compartiment supérieur (0,1%) et le compartiment inférieur (10%).

Les cellules ( $4 \times 10^4$ ) sont placées sur la face supérieure de l'insert puis sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La durée d'incubation est déterminée de telle façon qu'il n'y ait pas de prolifération des cellules. Après le temps d'incubation, les inserts sont retirés des puits puis traités avec le protocole suivant :

- Rinçage au PBS (2 minutes).
- Fixation des cellules au méthanol (10 minutes).
- Coloration par l'hématoxyline de Harris (2 minutes).
- Deux rinçages successifs dans l'eau (2 minutes chacun).

Ensuite, à l'aide d'un coton-tige, il faut enlever les cellules se trouvant sur la face supérieure de la membrane de l'insert et qui n'ont pas migré. Puis, les cellules se trouvant sur la face inférieure sont comptées à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x40). Le nombre de cellules par insert est estimé par le comptage de 20 champs à ce grossissement. Par ce système ne sont comptées que les cellules capables d'effectuer un déplacement actif pour passer à travers les pores.

Le dispositif expérimental pour l'évaluation de l'invasion cellulaire est similaire à celui utilisé pour la migration cellulaire. La différence entre ces deux techniques est que la membrane de l'insert utilisé pour l'invasion cellulaire (insert d'invasion BD 354480) est recouverte d'une couche de Matrigel afin de simuler la matrice extracellulaire (MEC). Pour traverser les pores de la membrane de PET, la cellule va devoir au préalable dégrader la couche de Matrigel à l'aide d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinase, cathépsine, etc.). Le Matrigel est extrait à partir de sarcome de souris (tumeur riche en MEC), il contient environ 60% de laminine, 30% de collagène IV, 8% d'entactine ainsi que divers facteurs de croissances.

Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé pour la migration cellulaire. Il est nécessaire d'incuber les inserts d'invasion à 37°C avec du PBS (800µL) 2h avant de placer les cellules. Cette étape préliminaire permet de préparer la couche de Matrigel. La coloration et le comptage des cellules restent identiques à ceux utilisés pour la migration.

## 2.8 Mesure de la viabilité cellulaire : Test au MTT

Le principe de ce test permettant l'évaluation de la viabilité cellulaire est basé sur la réduction de l'anneau de tétrazolium par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration dépend de l'activité métabolique des cellules et est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes. Les différentes étapes sont décrites ci-dessous :

- Après avoir éliminé le milieu, on ajoute 800 µl de MTT (0,5 mg/ml préparé dans le milieu de culture, Sigma) par puits pour une plaque 6 puits (Nunc 140685).
- Les cellules sont incubées pendant 50 minutes à 37°C.
- Le MTT est éliminé puis on ajoute 800 µl de DMSO (Sigma) pour dissoudre les cristaux de formazan.
- le contenu de chaque puit est transféré dans une plaque 96 puits (200 µL dans 4 puits) (Greiner bio-one 650101).
- Puis lecture au spectrophotomètre (Infinite pro200, Tecan) DO : 490-630 nm.

## 2.9 Analyse par PCR en temps réel.

Des culots secs de cellules transfectées sont récupérés après centrifugation et aspiration du surnageant. L'isolation des ARN, ADN et des protéines se fait avec 1 mL de TRIzol™ et la séparation des différentes phases avec 200 µL de bromo-chloroforme. Après centrifugation à 12 rcf (force centrifuge relative) pendant 15 minutes à 4°C, la phase contenant de l'ARN (transparente) est récupérée et précipitée avec 500 µL de 2-isopropanol. Après une seconde centrifugation de 12 rcf pendant 15 minutes à 4°C, un culot d'ARN apparaît, ce dernier est resuspendu avec 500 µL d'éthanol 70%, mélangé par vortex, puis recentrifugé à 7,5 rcf pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est de nouveau suspendu dans de l'alcool 70% et centrifugé à 7,5 rcf pendant 5 minutes à 4°C. Enfin, l'ARN obtenu est séché à l'air libre, puis resuspendu dans 25 µL d'eau stérile (Annexe 3, Figure 3).

Le dosage des ARN extraits est réalisé par mesure de leur absorbance par spectrophotométrie à 260 nm. L'analyse de la pureté de l'ARN se fait par mesure des absorbances à 230, 280, et 320 nm.

Une RT-PCR est d'abord réalisée, elle consiste en la synthèse *in vitro* d'un brin d'ADNc (complémentaire) à partir d'extraits d'ARN (qui serviront de brin matrice) par l'action d'une enzyme spécifique : la rétrotranscriptase. La concentration des ARN extraits et ramenée à 2 µg pour 13,5 µL d'eau stérile puis incorporé au mélange de Retro Transcription

(2  $\mu$ L Tampon, 2  $\mu$ L de tampon, 0.8  $\mu$ L de dNTP, 1  $\mu$ L d'inhibiteur d'ARNase) qui est ensuite placé dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler gradient). Le programme de RT (1 cycle) utilisé est le suivant :

- Hybridation des amorces sur l'ARN à 25°C pendant 10 minutes.
- Synthèse d'ADNc à 37°C pendant 120 minutes.
- Séparation des amorces, des ARN et des ADNc néosynthétisés à 85°C pendant 5 minutes.
- Conservation à 4°C.

Une qRT-PCR est ensuite réalisée, le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à un instant  $t$  grâce à des sondes fluorescentes qui se fixent sur l'ADN. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de la PCR. La quantité d'amplicons reflète la quantité d'ADN présente dans l'échantillon initial.

Les ADNc néosynthétisés sont dilués au 1/20<sup>ème</sup> puis ajoutés au milieu réactionnel : 14  $\mu$ L d'amorces et 128  $\mu$ L de Syber mix (contenant la sonde fluorescente SYBR® Green R, la Taq polymérase et les dNTPs) dans un volume total de 200  $\mu$ L. Les mélanges sont homogénéisés et déposés dans des puits d'une plaque contenant 384 puits (MicroAmp® Optical 384-well Reaction Plate). La plaque est mise dans le QuantStudio™ 7, après avoir paramétré le programme sur QuantStudio™ 7 Flex System Software. La PCR est lancée pour 40 cycles. L'expression de MAGT1 et *trpm7* est comparée à celle d'un gène de référence, la protéine intectine 8 (*IPO8*), choisie pour être stable dans les lignées cancéreuses pancréatiques (les séquences des différentes amorces utilisées sont disponibles en annexe).

## **2.10 Analyses statistiques :**

Tous les résultats sont présentés sous forme de Moyenne  $\pm$  Erreur Standard à la Moyenne. Pour le MTT, il y a eu 2 mesures par condition et par passage. Pour la migration et l'invasion, il y a eu comptage de 40 champs par condition et par passage.  $N$  représente le nombre de passages cellulaires testés et donc le nombre d'expériences indépendantes. Un test de Kolmogorov-Smirnov est réalisé pour déterminer si les échantillons suivent bien une loi normale. Si les échantillons suivent une loi normale, alors un test paramétrique de Student est utilisé pour comparer les deux moyennes. Si les échantillons ne suivent pas une loi normale,

alors un test non-paramétrique de Mann-Whitney est utilisé pour comparer les deux médianes. Pour les cas à plus de deux groupes, une ANOVA a été réalisée. Une différence est considérée comme significative si le  $P$  calculé est inférieur à 0,05. Les différences significatives sont représentées sur les graphiques à l'aide des symboles suivants : \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### **3 RESULTATS**

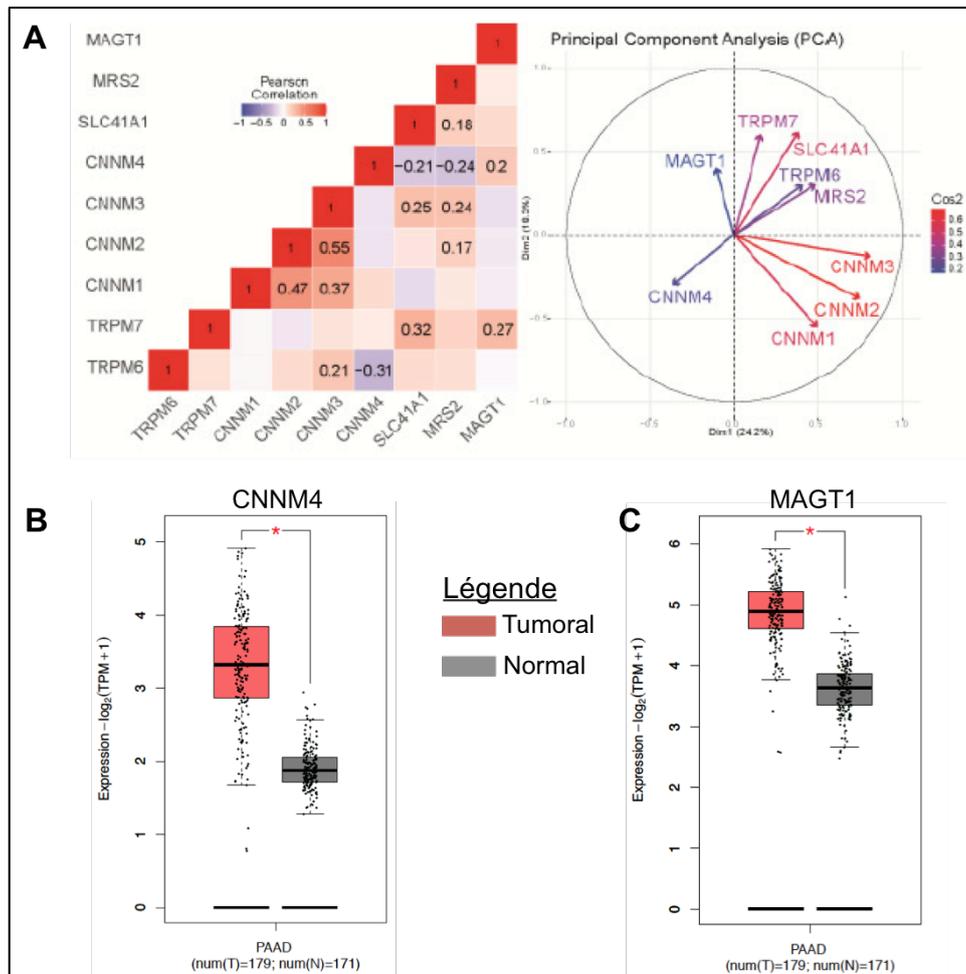
#### **3.1 Expression des différents transporteurs au magnésium à partir des données du TCGA et de Protein Atlas.**

Le profil d'expression de 179 échantillons tumoraux *versus* 171 non-tumoraux a été comparé. La corrélation de l'expression des différents transporteurs au  $Mg^{2+}$  est déterminée à l'aide des données de la cohorte PAAD du TCGA. En nous basant sur ces données, une étude de notre équipe analysant l'expression des principaux transporteurs au  $Mg^{2+}$  dans plusieurs cancers digestifs a permis de mettre en évidence de nombreuses surexpressions dans plusieurs cancers digestifs (Auwerx, Rybarczyk et al., 2021). Dans ce travail ne seront présentées que les résultats intéressant l'ACP.

Dans l'ACP, une corrélation positive entre MAGT1 et TRPM7 ( $R=0,27$ ) et CNNM4 ( $R=0,2$ ) est mise en évidence. Il existe également une corrélation positive entre CNNM1, CNNM2, et CNNM3 ( $0,17 < R < 0,25$ ). Le transporteur mitochondrial MRS2 est, quant à lui, corrélé positivement à CNNM2, CNNM3 et SLC41A1. SLC41A1 est également corrélé positivement à CNNM3 et TRPM7. Il existe, à l'inverse, une corrélation négative entre CNNM4 et SLC41A1 ( $R=-0,21$ ) et MRS2 ( $R=-0,24$ ). L'analyse en composante principale nous apporte aussi l'information que chez les différents patients, l'expression de MAGT1, CNNM4 et TRPM6 est indépendante (figure 1, A).

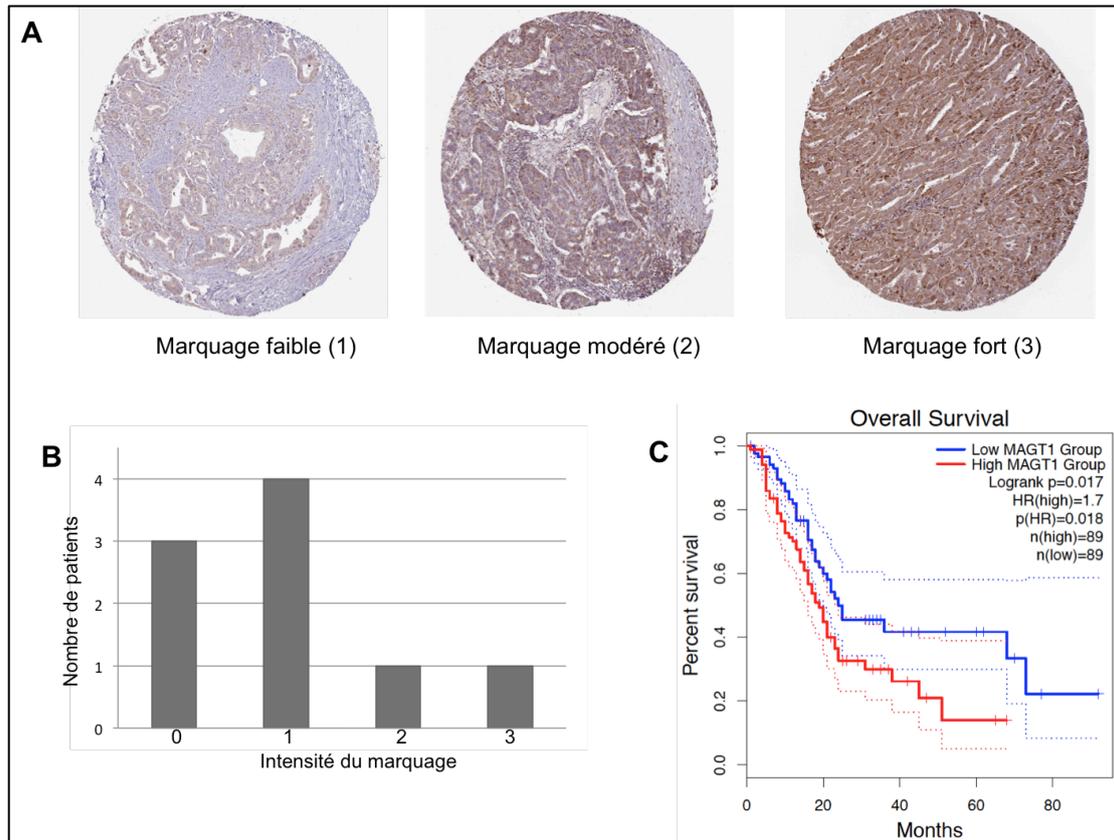
L'analyse de l'expression de ces différents transporteurs dans les tissus pancréatiques tumoraux *versus* tissus sains, toujours à l'aide des banques de données compilées du TCGA et de GTEX, est ensuite réalisée. Une surexpression de MAGT1 et de CNNM4 statistiquement significative ( $p < 0,01$ ) dans les tissus tumoraux pancréatiques est observée (figure 1, B, C).

L'analyse de l'expression de MAGT1 en immunohistochimie à l'aide de Protein Atlas a mis en évidence une expression de la protéine dans 67% des tissus tumoraux pancréatiques testés (6/9, figure 2 B). L'intensité de marquage est majoritairement faible avec pour un patient un marquage modéré et pour un autre un marquage fort (figure 2, A et B).



**Figure 1 :** Analyse de l'expression des différents transporteurs au Mg<sup>2+</sup> à l'aide des données du TCGA et du GTEx. **A**, analyse en composante principale permettant la détermination de l'absence ou présence d'une corrélation positive ou négative entre plusieurs transporteurs. **B**, analyse de l'expression en ARNm de CNNM4 en fonction des tissus tumoraux ou sains. **C**, analyse de l'expression en ARNm de MAGT1 en fonction des tissus tumoraux ou sains (Auwercx, Rybarczyk et al., 2021).

Finalement, une analyse de la survie en fonction de la surexpression de MAGT1 dans la cohorte PAAD du TCGA a été effectuée à l'aide du site GEPIA2. Cette dernière montre une diminution significative (p=0,017) de la survie pour les patients surexprimant le transporteur MAGT1 (figure 2, C).



**Figure 2 :** expression de MAGT1 en immunohistochimie (Protein Atlas) et analyse de survie (TCGA GEPIA2). A, Exemple d’immunomarquage anti-MAGT1 d’intensité différente. B, histogramme résumant le nombre de patient par catégorie d’intensité de marquage. C, courbe de survie différenciant les patients surexprimant MAGT1 et ceux l’exprimant faiblement (Auwercx, Rybarczyk et al., 2021).

Devant ces résultats préliminaires encourageants, notre expertise de l’implication du canal TRPM7 dans la physiopathologie de l’ACP et des données bibliographiques disponibles, nous avons décidé pour la suite de ce travail de nous intéresser à l’expression et au rôle physiopathologique de MAGT1 dans l’ACP.

### 3.2 Caractéristiques des patients de l’étude.

Pour les 18 patients de cette étude, L’âge moyen est de 69 ans, la moyenne de la taille des tumeurs était de  $3,5 \pm 0,99$  cm. Les autres principales caractéristiques clinico-pathologiques sont présentées dans le tableau 1 :

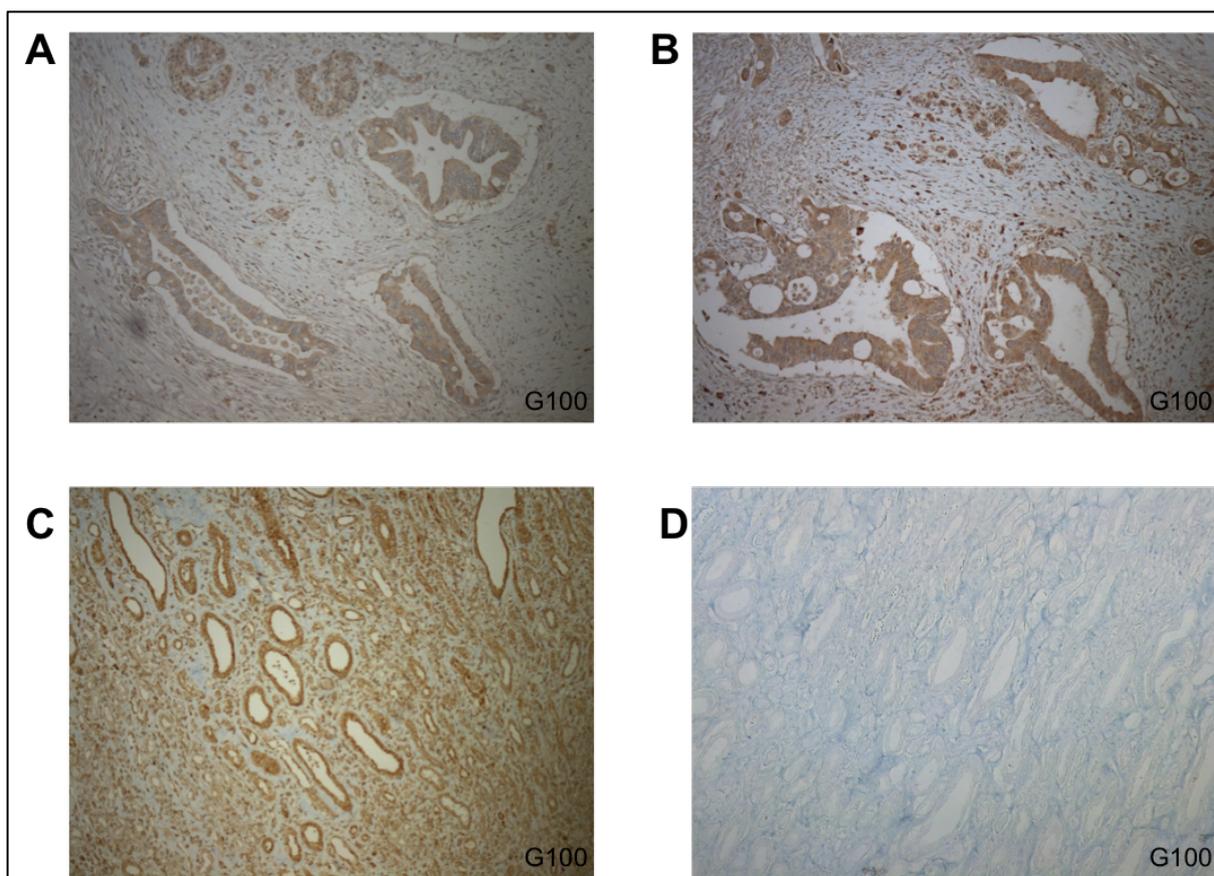
|                         |                                    |                           |                                  |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Sexe                    | Femme : n=9 (50 %)                 |                           | Homme : n=9 (50%)                |
| Localisation            | Tête du pancréas :<br>n= 12 (68 %) |                           | Queue du pancréas :<br>n=6 (32%) |
| Taille                  | T1 ≤ 2 cm :<br>n=3 (17%)           | T2 ≤ 4 cm :<br>n=11 (61%) | T3 > 4cm :<br>n=4 (22%)          |
| Grade tumoral           | G1 : n=11 (63%)                    | G2 : n=7 (27%)            | G3 : n=0 (0%)                    |
| Statut ganglionnaire    | N0: n=4 (22%)                      | N1: n=9 (50%)             | N2 : n=5 (28 %)                  |
| Engainement périnerveux | EPN+ : n=17 (95%)                  |                           | EPN- : n=1 (5%)                  |
| Invasion vasculaire     | IV+ : n=12 (68%)                   |                           | IV- : n=6 (32%)                  |
| Statut métastatique     | M1 : n=4 (32%)                     |                           | M0 : n=14 (68%)                  |
| Résection               | R0 : n=8 (47%)                     |                           | R1 : n=10 (53%)                  |

**Tableau 1 : résumé des différentes caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des 18 patients inclus dans notre étude.**

### 3.3 Etude immunohistochimique de l'expression de MAGT1 :

L'expression de MAGT1 a été étudiée par technique immunohistochimique en utilisant des coupes tissulaires d'ACP en comparaison au tissu sain péri-tumoral. Pour ce faire, deux différents anticorps ciblant MAGT1, l'un fourni par Alomone et l'autre par Sigma ont été sélectionnés.

Différentes dilutions (1/20, 1/50, 1/100) associées à différents prétraitements ont été testées. Ces différents tests nous ont permis de sélectionner, pour la suite de ce travail, l'anticorps anti-MAGT1 fourni par Sigma à la dilution 1/50 avec utilisation du kit optiview DAB IHC (roche diagnostic). En effet, cette dilution a permis l'obtention d'un immunomarquage d'une intensité satisfaisante tout en conservant une bonne spécificité avec l'absence de marquage du stroma tumoral (figure 3, A, B). Un test sur un organe de référence indiqué par le fabricant a été effectué. Dans notre cas, il s'agissait d'une coupe de parenchyme rénal où un marquage intense de MAGT1 dans les tubules rénaux est normalement retrouvé (figure 3, C). Enfin, une série de tests n'utilisant pas l'anticorps secondaire a permis de mettre en évidence l'absence de marquage aspécifique (figure 3, D).

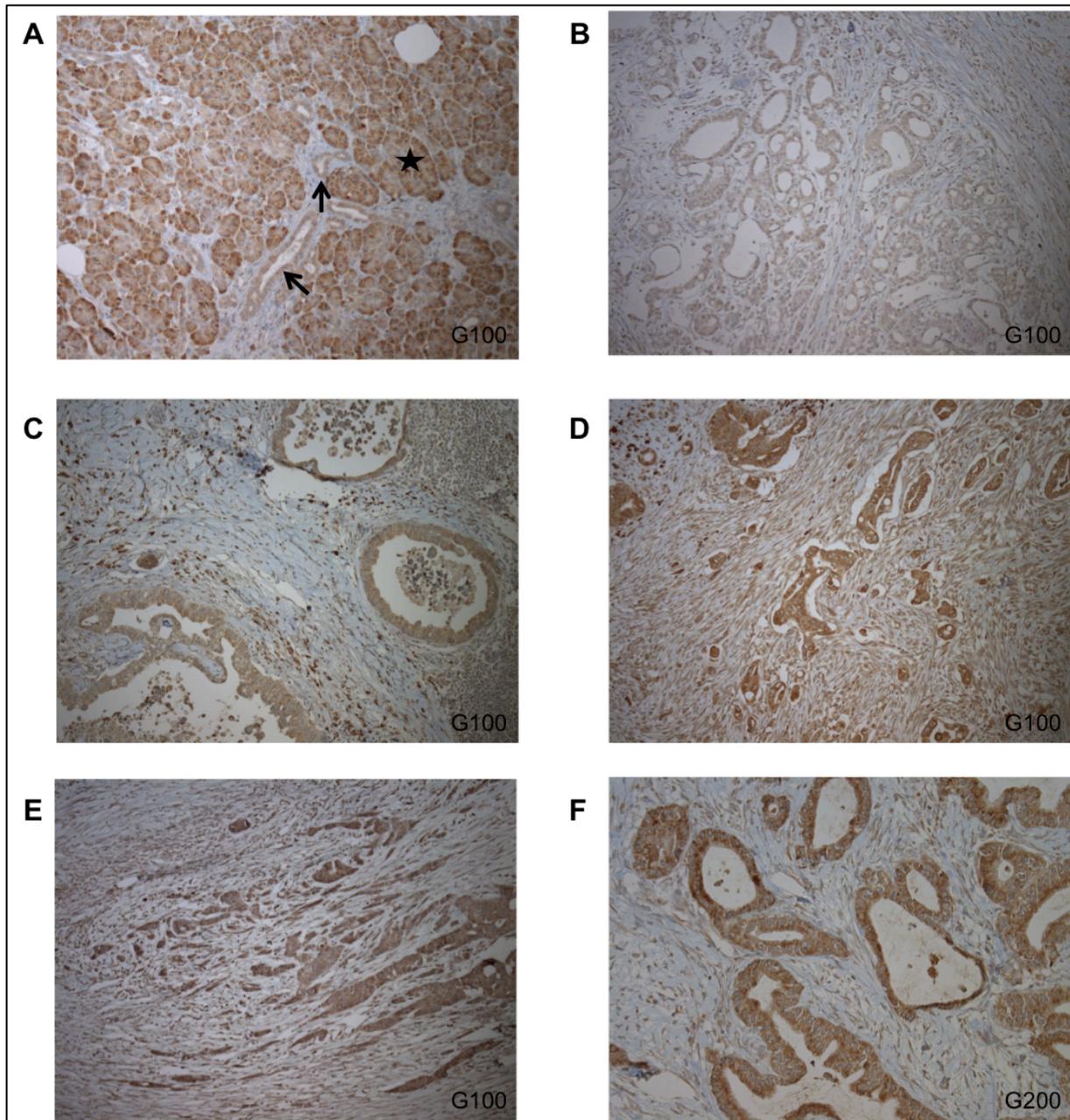


**Figure 3: Mise au point de l'anticorps anti-MAGT1 (Sigma).** A, test de la dilution 1/100. B, test de la dilution 1/50. C, parenchyme rénal (médullaire) avec immunomarquage anti-MAGT1 intense dans les tubules rénaux. D, Aspect morphologique obtenu en omettant l'ajout de l'anticorps secondaire, parenchyme rénal (médullaire).

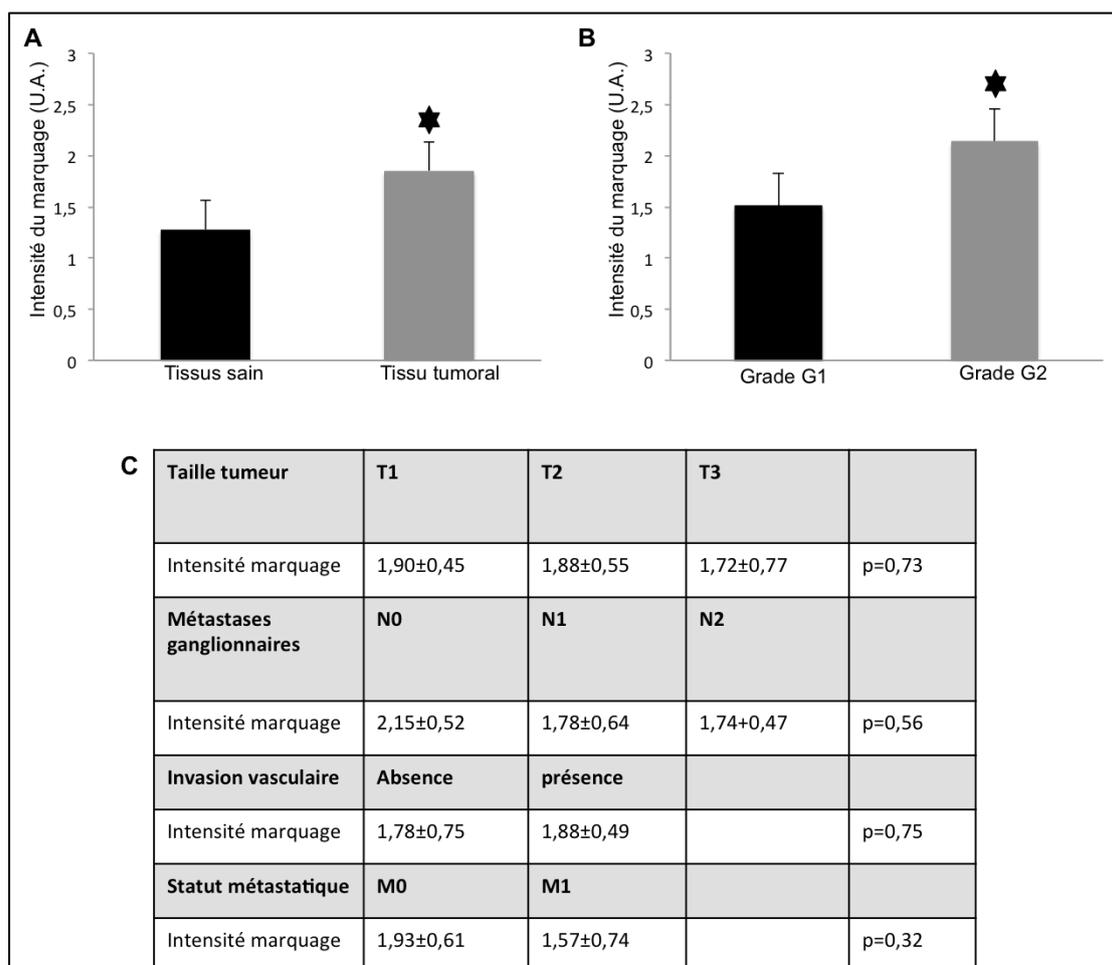
La lecture des différentes lames marquées par l'anticorps anti-MAGT1 a permis de retrouver une expression de ce dernier chez l'ensemble de nos patients sélectionnés. L'intensité du marquage a été considérée comme faible pour 17% des cas (n= 3) (scoring  $\leq 1$ ), modérée pour 61% des patients (n= 11) ( $1 < \text{scoring} \leq 2$ ) et intense pour 22% (n=4) (scoring  $> 3$ ) (figure 4, B, C, D). Un marquage au sein des canaux pancréatiques sains en périphérie de la zone tumorale a été également observé ; ce marquage était faible pour 72% des patients (n=13) et modéré pour 28% (n=5) (figure 4, A). Au sein du tissu non-tumoral, il a été remarqué un marquage classique non-spécifique des acini pancréatiques (figure 4, A). Une augmentation de l'intensité du marquage a été mise en évidence avec la progression de la dédifférenciation tumorale. En effet, les tissus tumoraux de grade G1 présentaient un marquage d'intensité moindre, comparés à ceux de grade G2 (figure 4, C, D, E). Finalement, une analyse au plus fort grossissement (G200) de la répartition de l'immunomarquage anti-

MAGT1 a mis en évidence un marquage cytoplasmique diffus confirmant les observations des phases de tests (figure 4, F).

La quantification de l'expression de MAGT1 en immunohistochimie dans notre série de patients a permis de mettre en évidence une expression significativement plus importante au sein des tissus tumoraux comparée aux tissus non-tumoraux. En effet, l'intensité de marquage était quantifiée à  $1,28 \pm 0,39$  (n=18) pour les tissus non-tumoraux *versus*  $1,85 \pm 0,43$  pour les tissus tumoraux (n=18 ; p=0,03 ; figure 5A). Ensuite, une corrélation de l'intensité du marquage anti-MAGT1 avec le grade tumoral a été réalisée. Ce marquage était quantifié à  $1,51 \pm 0,33$  pour les tumeurs de grade G1 (n=11) alors qu'il est de  $2,14 \pm 0,32$  pour les tumeurs de grade G2 (n=7) ; cette différence étant significative avec un p=0,019 (figure 5B). L'intensité de marquage dans les tissus tumoraux en fonction de la taille de la tumeur, la présence de métastases ganglionnaires ou à distance et de la présence d'invasion vasculaire étaient ensuite analysés. Pour l'ensemble de ces paramètres, les valeurs numériques sont résumées au sein du tableau de la figure 5C. L'analyse statistique ne mettait pas en évidence de différences pour l'ensemble de ces paramètres.



**Figure 4 : Immunomarquage anti-MAGT1 dans l'ACP.** A, Tissu sain peri-tumoral. Marquage faible visualisé au sein des canaux pancréatiques sains (flèche noire), présence d'un marquage non spécifique au sein des acini pancréatiques (étoile noire). B, ACP grade G1 présentant un immunomarquage faible. C, ACP grade G1 présentant un immunomarquage modéré. D, E, ACP grade G2 avec marquage fort. F, image au plus fort grossissement permettant d'observer un marquage cytoplasmique diffus de MAGT1 au sein des cellules tumorales.

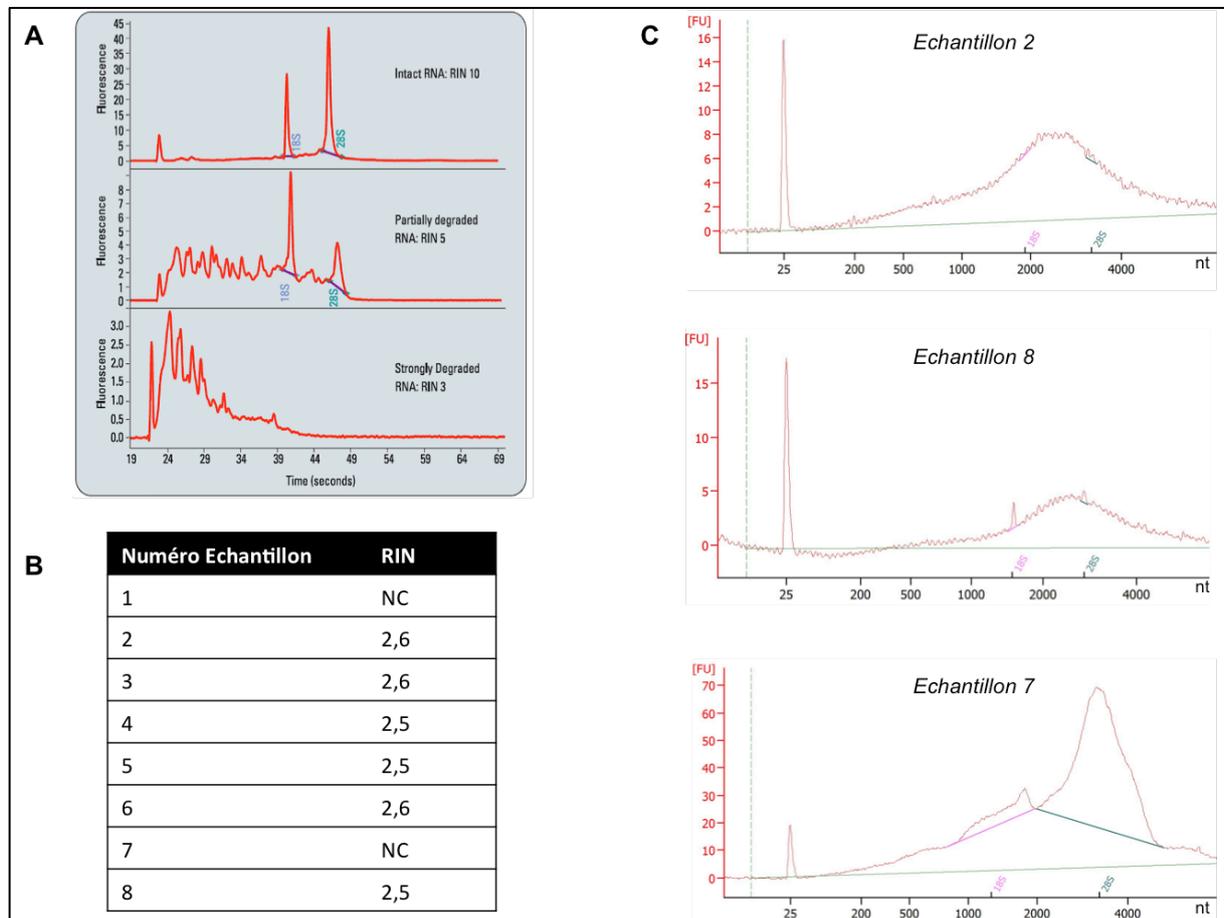


**Figure 5 : corrélation intensité immunomarquage et paramètre anatomo-clinique. A,** Intensité du marquage dans le tissu sain peri-tumoral comparé au tissu tumoral,  $p \leq 0,05$ . **B,** Intensité du marquage en fonction du grade tumoral,  $p \leq 0,05$ . **C,** tableau résumant l'intensité du marquage des différents autres paramètres anatomo-clinique.

### 3.4 Extraction d'ARN à partir de tissus inclus en paraffine.

L'extraction d'ARN est réalisée selon la technique automatisée et standardisée pour l'analyse des transcrits de fusion par NGS (Next Generation Sequencing). Une fois l'extraction réalisée, le dosage par fluorimétrie est effectué. Ce dernier objective des quantités d'ARN s'échelonnant entre 3,24  $\mu\text{g/ml}$  et 18  $\mu\text{g/ml}$ . L'analyse de la qualité de ces ARN est ensuite effectuée sur Bioanalyser. Cette analyse a permis la détermination du RIN (RNA Integrity Number), celui-ci se situe entre 2,5 et 2,6 et est non calculable pour deux prélèvements (figure 6, B). Le chiffre attendu du RIN, en fonction de la qualité de l'ARN extrait, est représenté dans le graphique A de la figure 6. La comparaison des profils d'électrophorèse de nos échantillons à ceux attendus a mis en évidence une forte dégradation

de nos ARN. Les profils des échantillons 2, 7 et 8 sont illustrés dans la figure 6, C. Ils montrent une absence ou une faible quantité d'ARN ribosomal 18S et 28S témoignant de leur dégradation importante.

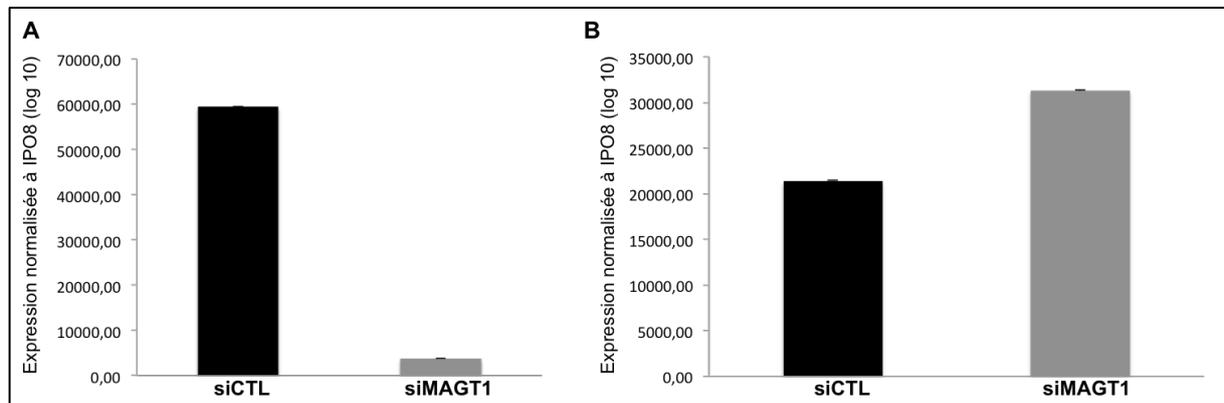


**Figure 6: Qualité des ARN après extraction automatisée sur échantillons inclus en paraffine.** A, Exemple des profils obtenus en électrophorèse en fonction de la qualité d'ARN. B, résultat du calcul du RIN pour nos 8 échantillons testés. C, Illustration de la qualité de notre extraction pour 3 échantillons représentatifs de notre série.

### 3.5 Quantification des transcrits de MAGT1 par qRT-PCR après transcription par siRNA des cellules PANC-1.

La technique utilisant les siRNA utilisée depuis de nombreuses années au sein du laboratoire a été démontrée comme robuste. Cette technique nécessite tout de même une validation de la diminution des ARNm de MAGT1 dans la condition siMAGT1 et la vérification de l'absence d'effet non-spécifique avec le siCTL. Dans notre étude, ce test a été effectué sur 2 expériences démontrant une diminution des transcrits de MAGT1 de  $93,7\% \pm$

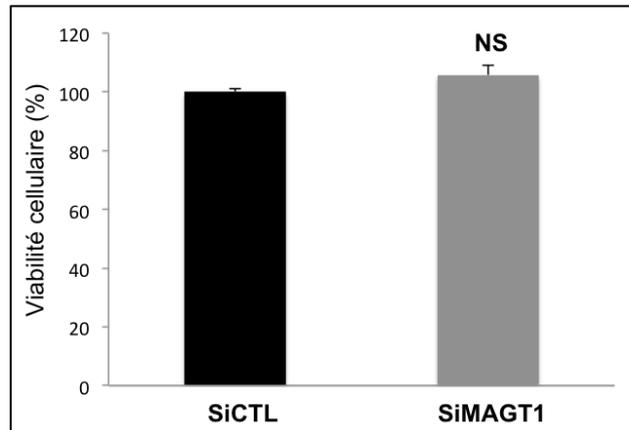
0,4 % avec le siMAGT1 en comparaison au siCTL (figure 7, A). L'impact de la transfection avec le siMAGT1 a été également testé sur l'expression des ARNm du transporteur au  $Mg^{2+}$ , TRPM7. L'inhibition de MAGT1 par le siMAGT1 a entraîné une augmentation de  $46\% \pm 0,5\%$  des ARNm de TRPM7 comparé à la condition siCTL (figure 7, B).



**Figure 7** : effet de la transfection avec le siMAGT1 en comparaison au siCTL sur le taux de transcrit de MAGT1 et TRPM7 dans les cellules PANC-1. L'ensemble des résultats a été présenté sous la forme de l'expression normalisée par rapport au gène de référence IPO8. A, Expression des ARNm de MAGT1 48h post-transfection par le siCTL ou le siMAGT1. B, expression des ARNm de TRPM7, même condition que A.

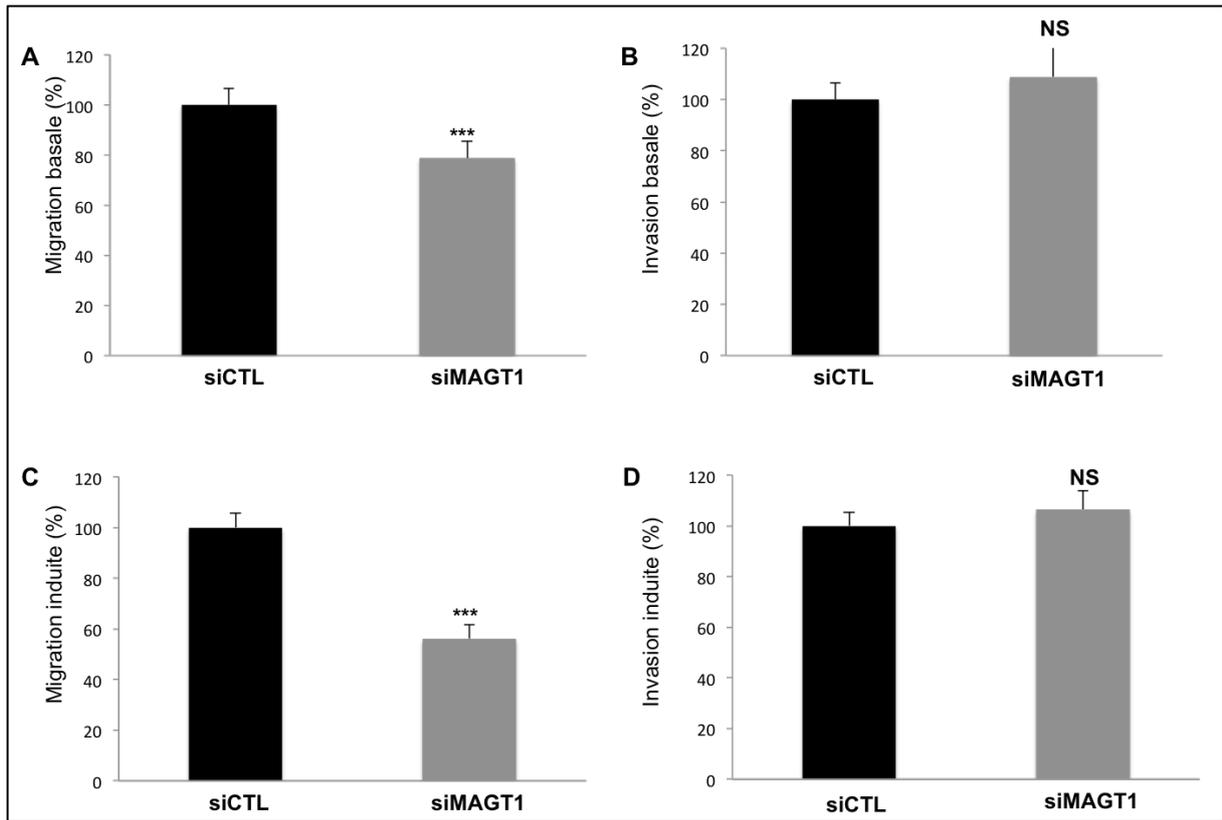
### 3.6 Implication de MAGT1 dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires.

Dans un premier temps, afin de s'affranchir d'un effet de la transfection sur la viabilité cellulaire, un test au MTT a été réalisé à 48h post transfection. Ce test a été effectué sur 5 expériences de transfection, il n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative sur la viabilité des cellules PANC-1 suite à l'extinction de MAGT1 par son siRNA *versus* le siCTL ( $105\% \pm 3,47$  pour siMAGT1 *versus*  $100\% \pm 0,99$  pour siCTL,  $p= 0,26$ ,  $N=5$ , figure 8).



**Figure 8 :** effet de l'inhibition de MAGT1 par siRNA sur la viabilité des cellules PANC-1

Les résultats obtenus concernant l'effet de l'extinction de MAGT1 sur la migration et l'invasion cellulaires basales (même concentration de SVF dans les deux chambres du dispositif) ont uniquement mis en évidence une diminution de la migration. En effet, la migration des cellules PANC-1 a été diminuée de 21, 2% après inhibition de MAGT1 par le siMAGT1 ( $78,8\% \pm 6,63\%$  pour siMAGT1 *versus*  $100\% \pm 6,59\%$  pour siCTL,  $p < 0.001$ ,  $N=4$ , figure 9A). Cet effet n'a pas été retrouvé au niveau de l'invasion avec  $108\% \pm 6,61\%$  pour la condition siMAGT1 comparée à  $100\% \pm 6,61\%$ , ( $p=0,33$ ,  $N=4$ ) pour la condition siCTL (figure 9B). Pour confirmer ces résultats, une autre série de deux expériences utilisant un gradient de SVF de part et d'autre des deux compartiments afin de reproduire un phénomène de chimiotactisme a été réalisée. Des résultats similaires à la condition basale ont été observés, avec une diminution de 44% de la migration des cellules PANC-1 48h après transfection avec le siMAGT1 (siMAGT1 :  $56\% \pm 5,58\%$  *versus* siCTL :  $100\% \pm 5,54$ ,  $p < 0.001$ ,  $N=2$ , figure 9C). Une absence d'effet sur l'invasion a donc également été observée (siMAGT1 :  $106,5\% \pm 7,42\%$  *versus* siCTL  $100\% \pm 5,32\%$ ,  $p=0,88$ ,  $N=2$ , figure 9D).



**Figure 9** : effet de l'inhibition de MAGT1 par siRNA sur la migration et l'invasion des cellules PANC-1 dans des conditions basales et induites. **A**, effet du siMAGT1 et du siCTL sur la migration basale des cellules PANC-1. **B**, effet du siMAGT1 et du siCTL sur l'invasion basale des cellules PANC-1. **C**, effet du siMAGT1 et du siCTL sur la migration induite des cellules PANC-1. **D**, effet du siMAGT1 et du siCTL sur l'invasion induite des cellules PANC-1. L'ensemble des résultats est exprimé en pourcentage de cellules migrantes ou invasives par rapport à la condition siCTL.

## **4 Discussion :**

Cette étude a permis par le biais des données du TCGA d'obtenir un meilleur aperçu de l'expression des transporteurs au  $Mg^{2+}$  dans l'ACP. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive pour l'expression de trois transporteurs, TRPM7, MAGT1 et CNNM4 dans les tissus tumoraux. La coexpression de ces 3 acteurs de l'homéostasie magnésique pourrait servir de signature moléculaire dans l'ACP. L'analyse du TCGA a également permis de mettre en évidence une surexpression de MAGT1 dans l'ACP et une corrélation de cette surexpression avec une plus faible survie des patients suggérant que MAGT1 est un facteur de mauvais pronostic dans l'ACP. Notre étude en immunohistochimie a mis en évidence les mêmes spécificités avec une surexpression de MAGT1 dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus non-tumoraux. Cette surexpression observée dans notre cohorte a été corrélée de manière significative à la dédifférenciation tumorale. Finalement l'étude de l'implication de MAGT1 dans les mécanismes cellulaires de l'ACP a démontré son rôle uniquement dans la migration des cellules PANC-1.

### **4.1 Expression de MAGT1 dans les tissus d'adénocarcinomes pancréatiques :**

L'analyse des données du TCGA a permis de mettre en évidence une corrélation positive de l'expression des transporteurs au  $Mg^{2+}$  TRPM7, MAGT1 et CNNM4 (figure 1A). Ce résultat d'une corrélation positive entre TRPM7 et MAGT1 n'est pas étonnant et a pris une part importante dans le choix de ce dernier comme sujet d'investigation pour ce travail de thèse. En effet, plusieurs études ont démontré une relation physiologique ou physiopathologique entre TRPM7 et MAGT1. Premièrement, la surexpression de MAGT1 dans des cellules DT40 déficientes en protéine TRPM7 permet la restauration de la prolifération cellulaire inhibée par l'absence de TRPM7 et ce, par une augmentation de la concentration intracellulaire du  $Mg^{2+}$  (Deason-Towne et al., 2011). Cette coopération entre TRPM7 et MAGT1 est également retrouvée pour la différenciation de cellules souches dans l'ostéogénèse (Castiglioni et al., 2019). En cancérogénèse, une étude a permis la mise en évidence dans des cellules d'adénocarcinome colique d'une surexpression de TRPM7 en

réponse à l'inhibition par siRNA de MAGT1 (Cazzaniga et al., 2017). Ces études compilées aux résultats du TCGA permettent de renforcer notre idée d'une probable association de ces deux transporteurs dans l'ACP.

MAGT1 a été démontré comme étant surexprimé dans l'ACP par le biais des données du TCGA et des quelques patients disponibles sur la plateforme Protein Atlas (figure 1C, figure 2A, 2B). Notre étude au sein de notre cohorte de 18 patients du CHU Amiens-Picardie a montré également une surexpression significative de MAGT1 dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus non-tumoraux. A notre connaissance, il n'existe pour le moment aucune autre étude ayant mise en évidence une surexpression de MAGT1 dans l'ACP. Un autre transporteur au  $Mg^{2+}$ , le canal TRPM7 a été mis en évidence par notre équipe comme étant surexprimé dans l'ACP. Le profil d'expression était d'ailleurs similaire à celui retrouvé dans notre étude avec une corrélation significative au grade tumoral (Rybarczyk et al., 2012). Ce constat renforce également la probable interaction TRPM7-MAGT1 décrite ci-dessus. Notre étude en immunohistochimie, au cours de ce travail, n'a pas permis de mettre en évidence d'autres corrélations significatives. En effet, l'étude statistique des « marqueurs » histopathologiques de la progression métastatique que sont : l'invasion ganglionnaire, les invasions vasculaires ou le statut métastatique, est non contributive. Cette absence de significativité peut en partie s'expliquer par l'effectif relativement faible de notre cohorte. Un autre facteur à prendre en compte est également que seuls les patients présentant, au moment du diagnostic, un cancer localement peu avancé, et donc souvent moins agressif, peuvent bénéficier d'une chirurgie. Ce dernier argument crée donc forcément un biais dans notre étude en concentrant les tumeurs de grade G1 et G2 (absence de G3) et favorisant l'absence de métastases et d'invasion tumorale ganglionnaire.

## **4.2 Extraction d'ARN sur fragments tissulaires fixé en paraffine.**

La technique utilisée au cours de ce travail n'a malheureusement pas permis d'obtenir une qualité d'ARN satisfaisante avec un RIN très bas et donc des ARN très dégradés (figure 6B, 6C). Ce cas de figure est classique lors d'une extraction à partir de fragments tissulaires inclus en paraffine. En effet, plusieurs études mettent en évidence des RIN similaires aux nôtres (Locy et al., 2021; Wimmer et al., 2018). Ces deux études, mais également la notice du bioanalyseur Agilent 2100 expliquent toutefois que, malgré un RIN très faible, une

amplification par PCR en temps réel a été obtenue. Dans notre cas, une transcription inverse puis une PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) ciblant MAGT1 ont été réalisées. Cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence d'amplification et ce, même sur les 3 gènes de références testés (données non présentées). Plusieurs explications à cet échec, aux vues des données de la littérature, ont pu être évoquées :

- La première est l'utilisation d'un système d'extraction automatisé ne permettant pas une optimisation des étapes à notre système d'analyse en qRT-PCR (le système est optimisé pour le séquençage). En effet, l'utilisation d'un kit d'extraction manuel serait préférable ; permettant une augmentation de l'épaisseur des copeaux de paraffine et une adaptation de la phase cruciale qu'est la durée d'incubation avec la protéinase K (Wimmer et al., 2018).
- Une autre source d'ARN trop dégradé est l'utilisation de matériel non-décontaminé pour les RNAses. Ces dernières sont susceptibles d'être retrouvées sur l'ensemble des supports du processus d'extraction (paillasse, gant, lame du microtome, ...). A ces problèmes s'ajoutent la durée de stockage des blocs de paraffine en air ambiant qui, pour cette technique ne devrait pas excéder 20 mois (Locy et al., 2021)
- Finalement, une optimisation du design de nos amorces est possiblement réalisable en diminuant la taille de l'amplicon souhaité et en rapprochant nos séquences de la région polyA de notre ARN cible. Cette zone est censée être la moins sujette à la dégradation.

Devant l'ensemble des ces données, nous avons prévu de recommencer les extractions avec un kit manuel en suivant le protocole fourni par Locy et al. Mais des défauts d'approvisionnement auprès du fournisseur ont rendu impossible la réalisation de ces expériences avant la rédaction de ce manuscrit.

### **4.3 Effets physiopathologiques de MAGT1 dans la lignée PANC-1.**

Les résultats de cette étude ont mis en évidence un rôle de MAGT1 dans la migration des cellules PANC1. En effet l'inhibition de MAGT1 par siRNA a entraîné une diminution significative des migrations basale et induite, sans induire d'effets sur l'invasion, ni sur la viabilité cellulaire (figure 8, figure 9).

Tout d'abord, l'absence d'effet de l'inhibition de MAGT1 sur la prolifération des cellules PANC-1 reste à confirmer. En effet, le test de viabilité au MTT effectué 48h post-transfection

est insuffisant. Il serait donc intéressant d'effectuer une cinétique sur 96h et compléter cette étude par une autre technique qu'est le comptage au bleu Trypan ou encore la cytométrie en flux.

Il n'existe pas d'autre étude de MAGT1 dans l'ACP, cependant deux autres études ont été réalisées sur des cellules d'adénocarcinomes coliques (Cazzaniga et al., 2017; Zheng et al., 2019). La première a porté sur son expression dans les tissus d'adénocarcinome colique avec, la mise en évidence d'une surexpression corrélée à l'agressivité de la tumeur (Zheng et al., 2019). La deuxième étude, plus physiopathologique, a centré son expertise sur le rôle de MAGT1 dans la prolifération des cellules d'adénocarcinome colique et leur résistance à la chimiothérapie. C'est cette même étude, qui a établi un lien entre l'expression de TRPM7 et MAGT1 dans l'adénocarcinome colique (Cazzaniga et al., 2017). Une étude a également étudié l'expression de MAGT1 dans l'hépatocarcinome avec un possible rôle pronostic (Molee et al., 2015). L'absence de données physiopathologiques dans l'ACP et plus généralement dans les cancers solides provient du fait que MAGT1 est beaucoup plus étudié dans la sphère hématologique. En effet, la mutation de MAGT1 entraîne le X-syndrome responsable d'un déficit immunitaire spécifique pouvant aboutir à un lymphome EBV induit.

La validation des transfections par siRNA a permis la démonstration d'une importante efficacité du siMAGT1 et de son impact sur le taux d'ARNm de TRPM7 (figure 7). Ce résultat vient renforcer encore une probable interaction entre ces deux transporteurs. Notre équipe a d'ailleurs mis en évidence un rôle de TRPM7 dans la migration des cellules BxPC3 d'ACP. Dans ces cellules, l'inhibition de TRPM7 par siRNA a entraîné une diminution de la migration cellulaire, cette dernière étant en partie restaurée par l'augmentation du  $Mg^{2+}$  extracellulaire (Rybarczyk et al., 2012). Ces nouveaux résultats pourraient suggérer un mécanisme de secours au sein de la cellule cancéreuse en cas d'inhibition de TRPM7 utilisant donc MAGT1 pour maintenir la concentration cytosolique de  $Mg^{2+}$  et le processus métastatique. Il serait donc intéressant de reproduire les expériences de migration avec un siMAGT1 dans des lignées n'exprimant pas de manière stable le canal TRPM7.

Explorer le rôle de MAGT1 dans la régulation du  $Mg^{2+}$  cytoplasmique serait également intéressant. Notre expérience préliminaire utilisant la technique d'imagerie cellulaire couplée à la sonde ratiométrique MagFura-2 a permis de mettre en évidence une diminution de la quantité basale de  $Mg^{2+}$  cytosolique lors de l'inhibition de MAGT1. En effet, le ratio basal correspondant arbitrairement à la concentration de  $Mg^{2+}$  cytoplasmique dans les

cellules siMAGT1 a été mesuré à  $0,29 \pm 0,04$  (n=9) alors que, dans les cellules siCTL il a été mesuré à  $0,44 \pm 0,05$  (n=21,  $p < 0,05$ ). Cette expérience n'a été réalisée que pour une transfection, ces résultats restent donc préliminaires et nécessitent de refaire deux nouvelles transfusions. Cependant, il semble y avoir un impact de MAGT1 sur l'homéostasie du  $Mg^{2+}$ .

## **5 Conclusion :**

Avec cette étude, nous avons pu mettre en évidence dans l'ACP un profil d'expression regroupant deux transporteurs au magnésium, MAGT1 et TRPM7. L'étude immunohistochimique de l'expression de MAGT1 a mis en évidence sa surexpression significative dans les tissus tumoraux d'ACP et sa corrélation au grade tumoral. Dans la lignée d'ACP PANC-1, les expériences mises en œuvre ont permis de mettre en lumière son rôle dans la migration cellulaire et son absence d'effet sur l'invasion cellulaire. Un profil similaire d'expression et d'implication dans la migration a déjà été observé par notre équipe pour un autre transporteur au  $Mg^{2+}$  : le canal TRPM7, dans une autre lignée d'ACP, BxPC-3. De plus, l'inhibition de MAGT1 par siRNA a également entraîné une diminution du taux d'ARNm de TRPM7. L'ensemble de ces résultats, associé aux données de la littérature, suggère fortement une probable association de ces deux transporteurs dans la progression tumorale de l'ACP.

La démonstration de cette interaction et de son mécanisme fera l'objet d'une étude complémentaire utilisant des techniques d'imagerie magnétique et de co-localisation protéique. En effet, ces expériences seront primordiales pour déterminer par quel(s) mécanisme(s) MAGT1 régule la migration cellulaire et l'expression de TRPM7. Deux hypothèses semblent envisageables à ce jour :

- La première est celle d'un effet direct sur la concentration cytoplasmique de  $Mg^{2+}$  (fonction transporteur).
- La deuxième est une probable régulation post-traductionnelle d'autre protéine comme le canal TRPM7 par le biais de son appartenance à un complexe de glycosylation.

Cette étude aura permis d'affiner un peu plus notre compréhension du rôle du  $Mg^{2+}$  et de ses transporteurs dans l'ACP même si de nombreuses questions persistent.

## 6 Bibliographie :

Auwercx, J., Rybarczyk, P., Kischel, P., Dhennin-Duthille, I., Chatelain, D., Sevestre, H., Van Seuningen, I., Ouadid-Ahidouch, H., Jonckheere, N., and Gautier, M. (2021). Mg<sup>2+</sup> Transporters in Digestive Cancers. *Nutrients* 13, 210.

de Baaij, J.H.F. (2015). The art of magnesium transport. *Magnes Res* 28, 85–91.

Bui, D.M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A., and Schweyen, R.J. (1999). The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 274, 20438–20443.

Castiglioni, S., Romeo, V., Locatelli, L., Zocchi, M., Zecchini, S., and Maier, J.A.M. (2019). The simultaneous downregulation of TRPM7 and MagT1 in human mesenchymal stem cells in vitro: Effects on growth and osteogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 513, 159–165.

Cazzaniga, A., Moscheni, C., Trapani, V., Wolf, F.I., Farruggia, G., Sargenti, A., Iotti, S., Maier, J.A.M., and Castiglioni, S. (2017). The different expression of TRPM7 and MagT1 impacts on the proliferation of colon carcinoma cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci Rep* 7, 40538.

Costello, R., Wallace, T.C., and Rosanoff, A. (2016). Magnesium. *Adv Nutr* 7, 199–201.

Deason-Towne, F., Perraud, A.-L., and Schmitz, C. (2011). The Mg<sup>2+</sup> transporter MagT1 partially rescues cell growth and Mg<sup>2+</sup> uptake in cells lacking the channel-kinase TRPM7. *FEBS Lett.* 585, 2275–2278.

Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A., and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425–435.

Dibaba, D., Xun, P., Yokota, K., White, E., and He, K. (2015). Magnesium intake and incidence of pancreatic cancer: the VITamins and Lifestyle study. *Br J Cancer* 113, 1615–1621.

Dominguez, L.J., Veronese, N., Guerrero-Romero, F., and Barbagallo, M. (2021). Magnesium in Infectious Diseases in Older People. *Nutrients* 13, E180.

- Goytain, A., and Quamme, G.A. (2005). Identification and characterization of a novel mammalian Mg<sup>2+</sup> transporter with channel-like properties. *BMC Genomics* 6, 48.
- Hu, J.-X., Zhao, C.-F., Chen, W.-B., Liu, Q.-C., Li, Q.-W., Lin, Y.-Y., and Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol* 27, 4298–4321.
- Kolisek, M., Nestler, A., Vormann, J., and Schweigel-Röntgen, M. (2012). Human gene SLC41A1 encodes for the Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C318-326.
- Locy, H., Correa, R.J.M., Autaers, D., Schiettecatte, A., Jonckheere, J., Waelput, W., Cras, L., Brock, S., Verhulst, S., Kwan, K., et al. (2021). Overcoming the Challenges of High Quality RNA Extraction from Core Needle Biopsy. *Biomolecules* 11, 621.
- Molee, P., Adisakwattana, P., Reamtong, O., Petmitr, S., Sricharunrat, T., Suwandittakul, N., and Chaisri, U. (2015). Up-regulation of AKAP13 and MAGT1 on cytoplasmic membrane in progressive hepatocellular carcinoma: a novel target for prognosis. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 9796–9811.
- Nadler, M.J., Hermosura, M.C., Inabe, K., Perraud, A.L., Zhu, Q., Stokes, A.J., Kurosaki, T., Kinet, J.P., Penner, R., Scharenberg, A.M., et al. (2001). LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411, 590–595.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., and Matrisian, L.M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913–2921.
- Raphael, B.J., Hruban, R.H., Aguirre, A.J., Moffitt, R.A., Yeh, J.J., Stewart, C., Robertson, A.G., Cherniack, A.D., Gupta, M., Getz, G., et al. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.e13.
- Rybarczyk, P., Gautier, M., Hague, F., Dhennin-Duthille, I., Chatelain, D., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Regimbeau, J.-M., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2012). Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int. J. Cancer* 131, E851-861.
- Rybarczyk, P., Vanlaeys, A., Brassart, B., Dhennin-Duthille, I., Chatelain, D., Sevestre, H.,

- Ouadid-Ahidouch, H., and Gautier, M. (2017). The Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel Regulates Pancreatic Cancer Cell Invasion through the Hsp90 $\alpha$ /uPA/MMP2 pathway. *Neoplasia* 19, 288–300.
- Schäffers, O.J.M., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M., and de Baaij, J.H.F. (2018). The rise and fall of novel renal magnesium transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 314, F1027–F1033.
- Schlingmann, K.P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., and Gudermann, T. (2007). TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 813–821.
- Shrimal, S., Cherepanova, N.A., and Gilmore, R. (2015). Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 41, 71–78.
- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., and Klöppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch.* 442, 444–452.
- Wimmer, I., Tröscher, A.R., Brunner, F., Rubino, S.J., Bien, C.G., Weiner, H.L., Lassmann, H., and Bauer, J. (2018). Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Sci Rep* 8, 6351.
- Worthington, V. (2001). Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *J Altern Complement Med* 7, 161–173.
- Xie, J., Cheng, C.-S., Zhu, X.Y., Shen, Y.H., Song, L.B., Chen, H., Chen, Z., Liu, L.M., and Meng, Z.Q. (2019). Magnesium transporter protein solute carrier family 41 member 1 suppresses human pancreatic ductal adenocarcinoma through magnesium-dependent Akt/mTOR inhibition and bax-associated mitochondrial apoptosis. *Aging (Albany NY)* 11, 2681–2698.
- Zheng, K., Yang, Q., Xie, L., Qiu, Z., Huang, Y., Lin, Y., Tu, L., and Cui, C. (2019). Overexpression of MAGT1 is associated with aggressiveness and poor prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett* 18, 3857–3862.

## 7 ANNEXE:

### 7.1 Séquences des siRNA utilisées:

| siARN   | ARN cible | Séquence                             |
|---------|-----------|--------------------------------------|
| siCTL   | Aucun     | 5'-CUG GAC AUG GAC CAA GUG GAC UU-3' |
| siMAGT1 | MAGT1     | 5'UCAUG UUACCUGCUCUCCAACUGCA-3'      |

### 7.2 Séquences des amorces de PCR utilisées :

| Gène cible | Séquence Sens/Antisens                            | Taille amplicon |
|------------|---|-----------------|
| MAGT1      | AGCAGTCAAGCCCAGTTTGT<br>CCAGCCACACACATTATCTTTTCGC | 140 pb          |
| TRPM7      | CTGTGCCTCCAAGAGGGGAG<br>CAGAGGCCTAGTTGTGACCA      | 103 pb          |
| IPO8       | CGAATTCAGTTGCCTCACAACC<br>TCTCCGGTCATGATGCCCAA    | 100 pb          |

## Implication du transporteur au magnésium MAGT1 dans le développement de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

**Introduction :** l'adénocarcinome pancréatique (ACP) est un des cancers les plus meurtriers avec une survie nette à 5 ans de 9%. La diminution de l'apport journalier en  $Mg^{2+}$  semble être liée à l'augmentation de l'incidence de ce cancer. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression des divers transporteurs au  $Mg^{2+}$  et plus particulièrement de MAGT1 dans l'ACP.

**Matériels et méthodes :** L'expression des principaux transporteurs cellulaires au  $Mg^{2+}$  a été étudiée à l'aide des données compilées du TCGA et de GTEX. Puis, l'expression de MAGT1 a été analysée en immunohistochimie dans une cohorte de 18 patients opérés d'un ACP au CHU Amiens-Picardie. Finalement le rôle physiopathologique de MAGT1 dans la migration et l'invasion des cellules d'ACP PANC-1 a été étudié.

**Résultat :** l'étude des données du TCGA a permis de démontrer une surexpression significative de MAGT1 dans les tissus tumoraux et une corrélation de cette expression avec TRPM7 et CNNM4. Une corrélation significative avec la faible survie des patients était également présente. Dans notre cohorte, l'étude de l'expression de MAGT1 par immunohistochimie a mis en évidence une surexpression significative de MAGT1 dans les tissus tumoraux *versus* non-tumoraux. Cette expression a été corrélée au grade tumoral. Dans la lignée PANC-1, l'inhibition de MAGT1 par siRNA a mis en évidence uniquement une diminution significative de la migration des cellules tumorales.

**Conclusion :** Cette étude a démontré la surexpression de MAGT1 dans l'ACP et son implication dans la migration des cellules PANC1.

Mots clés : Adénocarcinome pancréatique, MAGT1, Magnésium, TRPM7, migration, immunohistochimie, PANC-1

**Objective:** pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive cancers leading to low survival rates (9% at 5 years). A low  $Mg^{2+}$  intake was associated with an increase of the incidence of PDAC. The aim of this study was to investigate the role of  $Mg^{2+}$  transporters in PDAC with a focus on MAGT1.

**Material and method:**  $Mg^{2+}$  transporter expression in PDAC was assessed using TCGA and GTEX databases. MAGT1 expression was analysed using immunochemistry in 18 patients of the CHU Amiens-Picardie. Finally, the role of MAGT1 in PDAC cell migration and invasion was studied in PANC-1 cell line.

**Results:** TCGA database revealed an overexpression of MAGT1 in PDAC tissues. This expression was correlated with the expression of TRPM7 and CNNM4. In our patient samples, an overexpression of MAGT1 was observed in tumoral tissues compared to their no-tumoral counterparts. Moreover, this overexpression of MAGT1 was associated with tumoral progression (grading). In PANC-1 cells, MAGT1 inhibition by siRNA showed a significant decrease of cell migration.

**Conclusion:** this study revealed an overexpression of MAGT1 in PDAC and a possible role in the regulation of PDAC cell migration.

Key words: Pancreatic cancer, MAGT1, Magnesium, TRPM7, cell migration, immunochemistry, PANC-1.