

# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

UNITE INSERM U1069 Nutrition Croissance et Cancer

## THÈSE

présentée par :

**Virginie DRIFFORT**

soutenue le : 24 novembre 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

### **Rôle du canal sodique $\text{Na}_v1.5$ et de la sous-unité auxiliaire $\beta_4$ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo***

**THÈSE dirigée par :**

**M. BOUGNOUX Philippe**  
**M. BESSON Pierre**

Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Université de Tours  
Maître de conférences, Université de Tours

**RAPPORTEURS :**

**Mme GUICHENEY Pascale**  
**M. GAUTIER Mathieu**

Directeur de recherche INSERM, Paris  
Maître de conférences, HDR, Université d'Amiens

**JURY :**

**M. BESSON Pierre**  
**M. BOUGNOUX Philippe**  
**M. GAUTIER Mathieu**  
**Mme GUICHENEY Pascale**  
**M. LE GUENNEC Jean-Yves**  
**M. ROGER Sébastien**  
**M. VAN COPPENOLLE Fabien**

Maître de conférences, Université de Tours  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier, Université de Tours  
Maître de conférences, HDR, Université d'Amiens  
Directeur de recherche INSERM, Paris  
Professeur des Universités, Université Montpellier 2  
Maître de conférences, HDR, Université de Tours  
Professeur des Universités, Université Lyon 1



# Remerciements

---

Une page se tourne et non sans peine...

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements au Dr. Pascale Guicheney, au Dr. Mathieu Gautier, au Pr. Fabien Van Coppenolle et au Pr. Jean-Yves Le Guennec, de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je tiens également remercier mes encadrants de thèse le Dr. Pierre Besson et le Dr. Sébastien Roger qui ont dirigé et encadré cette thèse pendant ces quatre années. Merci de m'avoir fait confiance à la fin de mon stage de master 2 et de m'avoir permis de continuer mon projet au cours de cette thèse. Merci à Pierre Besson pour ses précieux conseils, pour nos nombreuses discussions qu'elles soient scientifiques sur le projet ou non. Merci à Sébastien Roger de m'avoir initié à sa passion des canaux ioniques, comme il m'a souvent dit "les canaux ioniques, c'est la vie !". Je le remercie également pour sa "positive attitude" tout au long de mes travaux qui m'a permis de rester motivée. Merci à vous de m'avoir fait voyager pour présenter mes travaux, d'avoir eu la patience de me supporter, pour votre disponibilité et tous les conseils que vous m'avez apportés durant ces quatre années de thèse. Un grand merci également au Pr. Philippe Bougnoux d'avoir accepté d'être directeur de cette thèse.

Je souhaite remercier le Pr. Philippe Bougnoux et le Pr. Stéphan Chevalier, directeurs successifs de l'unité Inserm U1069 Nutrition, Croissance et Cancer, de m'avoir permis de réaliser mes différents stages ainsi que mon travail de thèse au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier le Dr. Pablo Pelgrin et le Dr. Maria-Luisa Cayuela de m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour m'initier aux techniques d'étude sur le poisson zèbre. Merci également au Dr. Carlos Martines Caceres, anatomo-pathologiste, de m'avoir initiée à l'immunohistochimie. Merci à tous les trois, à toute l'équipe et plus particulièrement à Monique Anchin pour leur accueil chaleureux. Merci également à Marie Carmen Rodenas de m'avoir accueillie chez elle pendant ce séjour. Merci à tous pour votre gentillesse et pour m'avoir fait découvrir la culture espagnole !

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Yves Le Guennec qui m'a permis de découvrir le monde de la recherche durant un stage d'observation et qui m'a donné l'envie de continuer dans cette voie.

J'adresse un grand merci au Dr. Séverine Marionneau-Lambot et à Thibault Oullier d'avoir participé aux différents projets de cette thèse en réalisant les expérimentations animales. Merci pour votre patience, votre gentillesse, votre savoir faire ainsi que vos précieux conseils lors de ces expérimentations pas toujours faciles !!!

Je souhaite remercier le Dr. Marie-Lise Jourdan pour avoir réalisé les études de cytométrie en flux. Merci pour tes conseils, ton soutien et nos moments de discussions toujours agréables et enrichissants.

Merci au laboratoire INSERM U 966 "Morphogenèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites" du 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment Dutrochet de m'avoir souvent accueillie pour mes expériences. Un grand merci à Alain, Anne et Christine pour leur aide précieuse et les discussions que nous avons eues.

Je tiens à remercier Isa pour son aide précieuse pour les manips, sa gentillesse, sa patience et son soutien de tous les jours ! Merci également pour tout ce que tu peux faire ou apporter au laboratoire.

Un grand merci à mes "colocs" ou "ex-colocs" de bureau, Marie, Ludo, Seb, Bilel, Lucie, Emeline pour votre bonne humeur toujours au rendez-vous, ces petits délires du moment, les chansons pourries du vendredi de Marie (qui m'ont manqué depuis que tu es partie !!), les discussions scientifiques ou non ....

Merci Ludo de m'avoir encadré durant mes différents stages, de m'avoir transmis tes connaissances et techniques.

Un énorme merci à tous les membres de l'unité Inserm U1069 pour la bonne ambiance, la convivialité qui règne au laboratoire, qui égaye les journées et qui redonne un petit coup de "boost" dans les moments difficiles. Merci à tous pour votre bonne humeur, votre aide et votre soutien qui m'ont énormément aidée pendant cette thèse !

Merci à Catherine Leroy, notre indispensable secrétaire ! Merci pour ta gentillesse, ta patience et ton écoute.

Merci Christophe Vandier pour tes conseils en "électrophy".

Merci à Aurélie, Romain pour votre aide et votre soutien.

Un grand merci à mes co-thésards : Lucie B, Emeline, Audrey, Laure, Lucie Ch, Sophie, Lucie Cl, Julie D, Ramez, Fabio, Bilel, Maxime et Julie (post-doc) qui ont été mes compagnons de paillasse pendant ces quatre années. Je sais que je n'ai pas toujours été très facile et je vous remercie de m'avoir supportée ! Je pense qu'avec le temps je me suis assagie ... (enfin j'espère !!). En tout cas un très grand merci à vous pour votre aide, vos conseils et toutes nos discussions au cours de ces années ainsi que pour votre soutien dans les derniers moments de ma rédaction.

Je souhaite également une heureuse thèse aux petits nouveaux Yann et Frédéric qui commencent cette incroyable aventure. Bonne chance et bon courage à vous pour la suite.

Emeline, Frédéric, je suis heureuse de vous donner le flambeau pour la suite du projet. Je sais qu'il est entre de très bonnes mains !!

Merci à Karine Mahéo, Caroline Goupille, Gunther Weber, Jacques Goré, Stephane Servais, Jean-François Dumas, Michelle Pinault, Elsa Lemaitre, Cyrille Guimares, Pascale Rio, Violetta Guérin, Aurore Lecaille et Morgan Aubry pour votre gentillesse et votre soutien.

Pour finir, je ne pourrais jamais remercier assez ma famille et mes proches pour tout leur soutien au cours de mes études. Merci à mes parents et à ma sœur sans qui je n'en serais pas arrivée là aujourd'hui ! Un grand merci à mes grands parents. La famille est ce que l'on a de plus cher au monde ! Je vous serais toujours reconnaissante d'avoir pris sur vous dans les moments difficiles, de m'avoir toujours soutenue et réconfortée lorsque je doutais et d'avoir cru en moi. Ca y est, ... l'émotion me submerge ... Merci du fond du cœur ! Merci également à mes beaux-parents pour votre gentillesse et votre soutien. Merci aux "voisamis" allias Copine et Georgio pour votre soutien et tous nos moments inoubliables. Et enfin, .... Toi Doudou... j'aurais tellement de chose à te dire.... Tu as toujours été à mes côtés, là pour moi quand j'en avais besoin, patient, rassurant et attentionné. Je te serais toujours entièrement

reconnaissante des efforts et sacrifices que tu as fait pour que j'en arrive jusque ici aujourd'hui !! Tu as su croire en moi, me rendre fière. A mon tour de te dire que je suis fière de toi, fière de ce que tu fais et encore plus fière de t'avoir dans ma vie. Je ne peux plus rien écrire à part,

MERCI....

## Résumé

---

L'expression anormale du canal sodique  $\text{Na}_v1.5$  dans le cancer du sein est corrélée au développement métastatique et à une mortalité augmentée. Le canal  $\text{Na}_v1.5$  est localisé dans les invadopodes des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 et augmente leur activité protéolytique par une modulation allostérique de l'échangeur NHE-1 et l'activation de protéases acides. *In vivo*, dans un modèle de xélogreffe sur souris NMRI nude, l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  potentialise la colonisation des poumons par les cellules cancéreuses mammaires humaines. Cette colonisation métastatique est inhibée par un traitement à la ranolazine, un inhibiteur pharmacologique des canaux  $\text{Na}_v$ . La sous-unité  $\beta_4$ , auxiliaire des canaux  $\text{Na}_v$ , voit son expression diminuer au cours de la progression cancéreuse, ce qui est associé *in vitro* à une augmentation de l'invasivité cellulaire. Cette augmentation d'invasivité semble indépendante du canal  $\text{Na}_v1.5$  et pourrait être associée à une transition des cellules vers un phénotype amiboïde. En conclusion, l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  et la perte d'expression de  $\beta_4$  semblent jouer des rôles complémentaires dans l'invasivité des cellules cancéreuses.

Mots clés : canaux sodiques dépendants du voltage, sous-unités auxiliaires  $\beta_4$ , matrice extracellulaire, invasivité cellulaire *in vitro*, métastases

## Résumé en anglais

---

The abnormal expression of sodium channel  $\text{Na}_v1.5$  in breast cancer is correlated with metastatic development and an increased mortality. The  $\text{Na}_v1.5$  channel is located in invadopodia in human breast cancer cells MDA-MB-231, where it increases proteolytic activity by allosteric modulation of exchanger NHE-1 and activation of acidic proteases. *In vivo*, in a xenograft model in nude NMRI mice, the expression of  $\text{Na}_v1.5$  potentiates lung colonization by human breast cancer cells. Metastatic colonization is inhibited by treatment with ranolazine, a pharmacological inhibitor of  $\text{Na}_v1.5$ . The  $\beta4$  subunit, an auxiliary subunit of  $\text{Na}_v$  channels, is expressed at low levels or lost when tumors are more aggressive, and its suppression *in vitro* increases cell invasiveness. This increase seems to be independent of  $\text{Na}_v1.5$  and could be associated with the transition of cells to an amoeboid phenotype. In conclusion,  $\text{Na}_v1.5$  expression and the loss of  $\beta4$  expression seem to play complementary roles in the invasiveness of cancer cells.

Keywords: voltage-gated sodium channel, auxiliary  $\beta4$  subunit, extracellular matrix, *in vitro* invasiveness, metastasis

# Table des matières

---

Table des matières .....	9
Liste des tableaux .....	12
Liste des figures .....	13
Liste des abréviations .....	16
Introduction.....	18
Première partie : Revue bibliographique .....	19
I. Les canaux sodiques dépendants du voltage .....	20
A. La sous-unité principale $\alpha$ : le pore du canal.....	21
1. Gènes .....	21
2. Structure et propriétés .....	22
3. Pharmacologie et régulation.....	28
4. Rôles de la sous-unité principale $\alpha$ $\text{Na}_v$ dans les cellules non excitables .....	37
B. Les sous-unités auxiliaires $\beta$ des canaux sodiques dépendants du voltage.....	39
1. Gènes et structure .....	39
2. Rôles des sous-unités $\beta$ sur les sous-unités principales $\alpha$ des canaux $\text{Na}_v$ .....	41
3. Autres rôles des sous-unités $\beta$ .....	44
4. Pathologies associées aux sous-unités $\beta$ dans les cellules excitables .....	50
II. Rôles des canaux sodiques dépendants du voltage et de leurs sous-unités auxiliaires $\beta$ dans les cellules cancéreuses .....	54
A. Cancérogénèse et développement des métastases .....	54
1. Migration et invasivité des cellules cancéreuses.....	54
2. Protéases et remodelage du microenvironnement tumoral.....	57
3. Métabolisme des cellules cancéreuses.....	58
B. Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses.....	60
C. Rôles des sous-unités $\beta$ dans les cellules cancéreuses .....	63
Objectif de la thèse .....	66
Deuxième partie : Matériels et méthodes .....	67
I. Lignées cellulaires.....	68
A. Cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines .....	68
1. Cellules épithéliales cancéreuses pulmonaires humaines.....	68

2.	Lignées cellulaires transformées génétiquement.....	69
B.	Protocoles expérimentaux utilisés en culture cellulaire .....	69
1.	Solutions et matériels utilisés .....	69
2.	Cryogénéisation et décryogénéisation des lignées cellulaires .....	70
3.	Trypsination des lignées cellulaires .....	70
4.	Evaluation de la viabilité cellulaire .....	71
5.	Evaluation de la motilité des cellules cancéreuses <i>in vitro</i> : tests de migration et d'invasivité.....	72
II.	Biologie moléculaire .....	74
A.	Etude de l'expression des ARN messagers par PCR .....	74
1.	Extraction des ARN totaux .....	74
2.	Transcription inverse .....	74
3.	Réaction de polymérisation en <i>chaîne</i> , PCR .....	75
B.	Transfection transitoire par des ARN interférents.....	80
C.	Construction d'un vecteur lentiviral codant pour un shRNA .....	82
1.	Construction des séquences codant pour des shRNA .....	82
2.	Clonage de la séquence d'intérêt dans le plasmide pGEM-T-easy .....	84
3.	Clonage de la séquence d'intérêt dans le plasmide pH1 .....	86
4.	Clonage de la séquence H1-shRNA dans le plasmide pLenti-GS-RNAi .....	87
5.	Production de particules virales à l'aide de cellules HEK-293-FT.....	87
D.	Transduction.....	88
E.	Etude de l'expression des protéines par western blotting .....	91
1.	Préparation des échantillons .....	91
2.	Electrophorèse sur gel .....	91
3.	Transfert sur membrane .....	92
4.	Détection par anticorps .....	92
III.	Patch clamp : Etudes de l'activité des canaux ioniques.....	95
A.	Principe de la technique de patch clamp .....	95
B.	Méthode.....	96
1.	Installation du poste de patch clamp.....	96
2.	Matériels et solutions utilisés .....	96
3.	Protocoles expérimentaux.....	97
IV.	Mesure du pH intracellulaire par spectrofluorimétrie.....	101
A.	Principe.....	101
B.	Méthode.....	101

1.	Isolement des cellules.....	101
2.	Mesure du pouvoir tampon $\beta$ i.....	102
3.	Mesure d'efflux de protons sur cellules acidifiées.....	103
V.	Expérimentation animale.....	104
A.	Modèle de colonisation métastatique.....	104
B.	Modèle de xénogreffe orthotopique.....	106
VI.	Statistiques.....	108
	Troisième partie : Résultats.....	109
I.	Le canal sodique $\text{Na}_v1.5$ stimule l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires en augmentant l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE-1 dans les invadopodes.....	110
A.	Introduction.....	110
B.	Article.....	112
C.	Résumé de l'article.....	125
D.	Discussion.....	125
II.	La ranolazine inhibe l'invasivité cellulaire et la colonisation pulmonaire induite par l'activité de $\text{Na}_v1.5$ .....	132
A.	Introduction.....	132
B.	Article.....	133
C.	Résumé de l'article.....	148
D.	Discussion.....	149
III.	Régulation de l'invasivité cellulaire et de la colonisation pulmonaire par la sous-unité auxiliaire $\beta$ 4 des canaux sodiques.....	156
A.	Introduction.....	156
B.	Résultats - Discussion.....	156
1.	Expression et rôles des sous-unités $\beta$ dans la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires.....	156
2.	Expression de la sous-unité $\beta$ 4 dans l'invasivité <i>in vivo</i> .....	160
3.	Rôle de la sous-unité $\beta$ 4 dans l'invasivité <i>in vivo</i> .....	162
4.	Implication de la sous-unité $\beta$ 4 dans le contrôle de l'invasivité cellulaire.....	166
5.	Rôle de la sous-unité $\beta$ 4 sur l'activité de $\text{Na}_v1.5$ et de l'échangeur NHE-1.....	167
6.	Rôles des différents domaines protéiques de la sous-unité $\beta$ 4 sur l'invasivité cellulaire.....	171
7.	Implication de la protéine $\beta$ 4 dans l'invasivité d'autres cellules cancéreuses humaines.....	176
	Conclusion et perspectives.....	178
	Références bibliographiques.....	185
	Résumé.....	205

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Description des différents rôles des sous-unités $\beta$ sur, ou indépendamment, des sous-unités principales $\alpha$ .....	47
<b>Tableau 2</b> : Expression en ARNm des sous-unités $\beta$ dans différents types de cancers. ....	64
<b>Tableau 3</b> : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés en PCR et qPCR et tailles attendues des fragments amplifiés. ....	77
<b>Tableau 4</b> : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blotting .....	93
<b>Tableau 5</b> : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le western blotting .....	94
<b>Tableau 6</b> : Composition de la solution physiologique saline (PSS) et du milieu intrapipette (MIP)....	97
<b>Tableau 7</b> : Composition de la solution physiologique de Hanks. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH.....	102

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les domaines des canaux sodiques ( $\text{Na}_v$ ) et calciques ( $\text{Ca}_v$ ) dépendants du voltage. ....	21
<b>Figure 2</b> : Structure des canaux sodiques dépendants du voltage. ....	23
<b>Figure 3</b> : Structure du pore du canal sodique bactérien $\text{Na}_v\text{Ab}$ . ....	24
<b>Figure 4</b> : Modèles du mécanisme du mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation. ....	26
<b>Figure 5</b> : Mécanisme d'ouverture du pore du canal $\text{Na}_v\text{Ab}$ .....	27
<b>Figure 6</b> : Structures moléculaires des deux agents pharmacologiques utilisés dans cette étude : la tétrodotoxine (A/) et la ranolazine (B/). ....	29
<b>Figure 7</b> : Différences moléculaires entre l'isoforme néonatale et l'isoforme adulte du canal $\text{Na}_v1.5$ . ....	30
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de $\text{Na}_v1.5$ et de ses partenaires protéiques. ....	35
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique d'une sous-unité auxiliaire $\beta$ seule ou en complexe protéique $\text{Na}_v-\beta$ . ....	39
<b>Figure 10</b> : Homologie entre les séquences protéiques des sous-unités $\beta$ .....	40
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de l'architecture fonctionnelle de la sous-unité $\beta 1$ . ....	46
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique du clivage protéolytique des sous-unités $\beta$ par les différentes sécrétases. ....	48
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique des sous-unités $\beta$ des $\text{Na}_v$ et leurs mutations associées à des anomalies cardiaques (tiré de Wilde AA et Brugada R, 2011). ....	52
<b>Figure 14</b> : Différents types de migration des cellules cancéreuses en fonction des interactions cellule-cellule, cellule-matrice et du phénotype mésenchymateux ou amiboïde. ....	56
<b>Figure 15</b> : Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. ....	62
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de l'évaluation <i>in vitro</i> de la motilité des cellules cancéreuses : test de migration et d'invasivité. ....	73
<b>Figure 17</b> : Détection et analyse des noyaux des cellules marqués au DAPI. ....	73
<b>Figure 18</b> : Etude de l'expression des ARNm. ....	76
<b>Figure 19</b> : Etapes conduisant à la formation d'un shRNA. ....	83
<b>Figure 20</b> : Transduction par un vecteur lentiviral et mécanisme d'interférence par ARN dans une cellule animale. ....	90

<b>Figure 21</b> : Schéma des différents protocoles utilisés. ....	99
<b>Figure 22</b> : Modèle de colonisation métastatique. ....	105
<b>Figure 23</b> : Modèle de xénogreffe orthotopique. ....	107
<b>Figure 24</b> : Effet de la culture des cellules MDA-MB-231 sur une matrice de Matrigel sur le courant sodique $Na_v1.5$ . ....	129
<b>Figure 25</b> : figure représentative de l'effet de la ranolazine sur le courant sodique.....	150
<b>Figure 26</b> : Effet de la ranolazine sur la migration des cellules MDA-MB-231.....	151
<b>Figure 27</b> : Analyse par cytométrie en flux de l'expression protéique de la luciférase dans les lignées transformées issues de MDA-MB-231.....	152
<b>Figure 28</b> : Développement <i>in vivo</i> des cellules MDA-MB-231 après une xénogreffe orthotopique. ....	154
<b>Figure 29</b> : Expression transcriptionnelle et protéique des sous-unités $\beta$ dans les cellules MDA-MB-231. ....	157
<b>Figure 30</b> : Effet de l'inhibition de l'expression des sous-unités $\beta$ sur la migration et l'invasivité des cellules MDA-MB-231. ....	158
<b>Figure 31</b> : Analyse de la probabilité de survie des patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction de l'expression des gènes des sous-unités $\beta$ . ....	159
<b>Figure 32</b> : Expression de la protéine $\beta4$ dans des tissus mammaires.....	160
<b>Figure 33</b> : Expression de la protéine $\beta4$ dans des tissus cancéreux mammaires. ....	161
<b>Figure 34</b> : Effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\beta4$ par un siRNA sur le développement de l'invasivité <i>in vivo</i> chez l'embryon de poisson zèbre. ....	162
<b>Figure 35</b> : Effet de la surexpression ou de l'inhibition de l'expression du gène <i>SCN4B</i> codant pour la protéine $\beta4$ sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231.....	164
<b>Figure 36</b> : Analyse de la bioluminescence des poumons de souris <i>ex vivo</i> en fonction de l'expression de la protéine $\beta4$ . ....	165
<b>Figure 37</b> : Rôle de l'expression de la sous-unité $\beta4$ sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231. ....	166
<b>Figure 38</b> : Influence de l'extinction de la sous-unité $\beta4$ sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231. ....	168
<b>Figure 39</b> : Influence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\beta4$ sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231. ....	169
<b>Figure 40</b> : Mesure de l'efflux de protonss en fonction de l'expression de la sous-unité $\beta4$ . ....	170
<b>Figure 41</b> : Schéma des séquences codant pour les protéines $\beta4$ tronquées ou entière dont non reconnues par le shRNA. ....	171
<b>Figure 42</b> : Rôle des différents domaines de la protéine $\beta4$ sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231. ....	172

<b>Figure 43</b> : Expression des gènes des différentes isoformes des sous-unités principales $\alpha$ de $\text{Na}_v$ et des sous-unités régulatrices $\beta$ dans les cellules MDA-MB-231-shCTL et MDA-MB-231-sh $\beta$ 4.....	173
<b>Figure 44</b> : Effet de l'inhibition de l'expression ou de la surexpression de la protéine $\beta$ 4 sur la circularité des cellules MDA-MB-231. ....	174
<b>Figure 45</b> : Activité protéolytique des cellules MDA-MB-231.....	175
<b>Figure 46</b> : Effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\beta$ 4 par un siRNA sur l'invasivité de différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires et pulmonaires, exprimant ou non un canal $\text{Na}_v$ .....	176
<b>Figure 47</b> : Expression de la protéine $\beta$ 4 dans des tissus cancéreux pulmonaires. ....	177
<b>Figure 48</b> : Schéma hypothétique de la participation des protéines $\text{Na}_v1.5$ / NHE-1 et $\beta$ 4 dans la formation des métastases. ....	184

# Liste des abréviations

---

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

BACE1 :  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme

BCECF-AM : 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Bovine Serum Albumin, albumin sérique bovine

CAM : Cell Adhesion molecule, molécule d'adhésion cellulaire

Ct : Threshold Cycle, cycle seuil

DHPE : 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF : Epidermal Growth Factor

EIPA : 5-N-ethyl-N-isopropyl amiloride

Ig : Immunoglobuline

kDa : kilo Dalton

KO : Knockout

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MIP : Milieu intrapipette

MMP : Matrix metalloproteases, métalloprotéases matricielles

MTT : 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphénylTétrazolium bromide

Na<sub>v</sub> : Canaux sodiques dépendants du voltage

NHE : Echangeur sodium-proton

NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide

PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne

pH : potentiel hydrogène

pH<sub>e</sub> : pH extracellulaire

pH<sub>i</sub> : pH intracellulaire

pH<sub>m</sub> : pH membranaire

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPC

PKC : Protéine kinase C

PSS : Physiological Saline Solution

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

shRNA : small hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SVF : Sérum de Veau Foetal

TTX : Tétrodotoxine

# Introduction

---

L'apparition de métastases suite à un cancer primaire est la cause majeure de décès par cancer. Il n'existe actuellement aucun traitement pour prévenir la formation des métastases. Il semble donc indispensable d'améliorer la compréhension des mécanismes conduisant à leur formation afin d'identifier les cibles moléculaires qui permettrait de prévenir ou ralentir leur apparition.

Il est admis depuis quelques années que les canaux ioniques, en plus de leur rôle majeur dans l'excitabilité cellulaire, pouvaient participer à d'autres phénomènes physio-pathologiques dans des cellules non excitables et notamment aux propriétés de prolifération, de migration et d'invasivité des cellules cancéreuses.

L'équipe de l'unité Inserm U1069 "Nutrition, Croissance et Cancer", contribue depuis plus de dix ans au développement des connaissances sur le rôle des canaux ioniques exprimés dans les cellules cancéreuses et sur les mécanismes de l'invasivité cellulaire. C'est dans ce cadre que m'a thèse s'est déroulée. Elle a porté sur l'étude de l'implication des canaux sodiques  $Na_v1.5$  et de la sous-unité auxiliaire  $\beta 4$  dans l'invasivité des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. Je me suis intéressée : 1) aux mécanismes par lesquels  $Na_v1.5$  module l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE-1 et conduit à la formation et l'activité des invadopodes ; 2) au rôle que jouent les sous-unités auxiliaires  $\beta$  des canaux  $Na_v$  dans ce phénomène ; 3) à la possibilité d'un ciblage pharmacologique de  $Na_v1.5$  *in vivo* pour prévenir ou ralentir la formation des métastases.

Première partie :  
Revue bibliographique

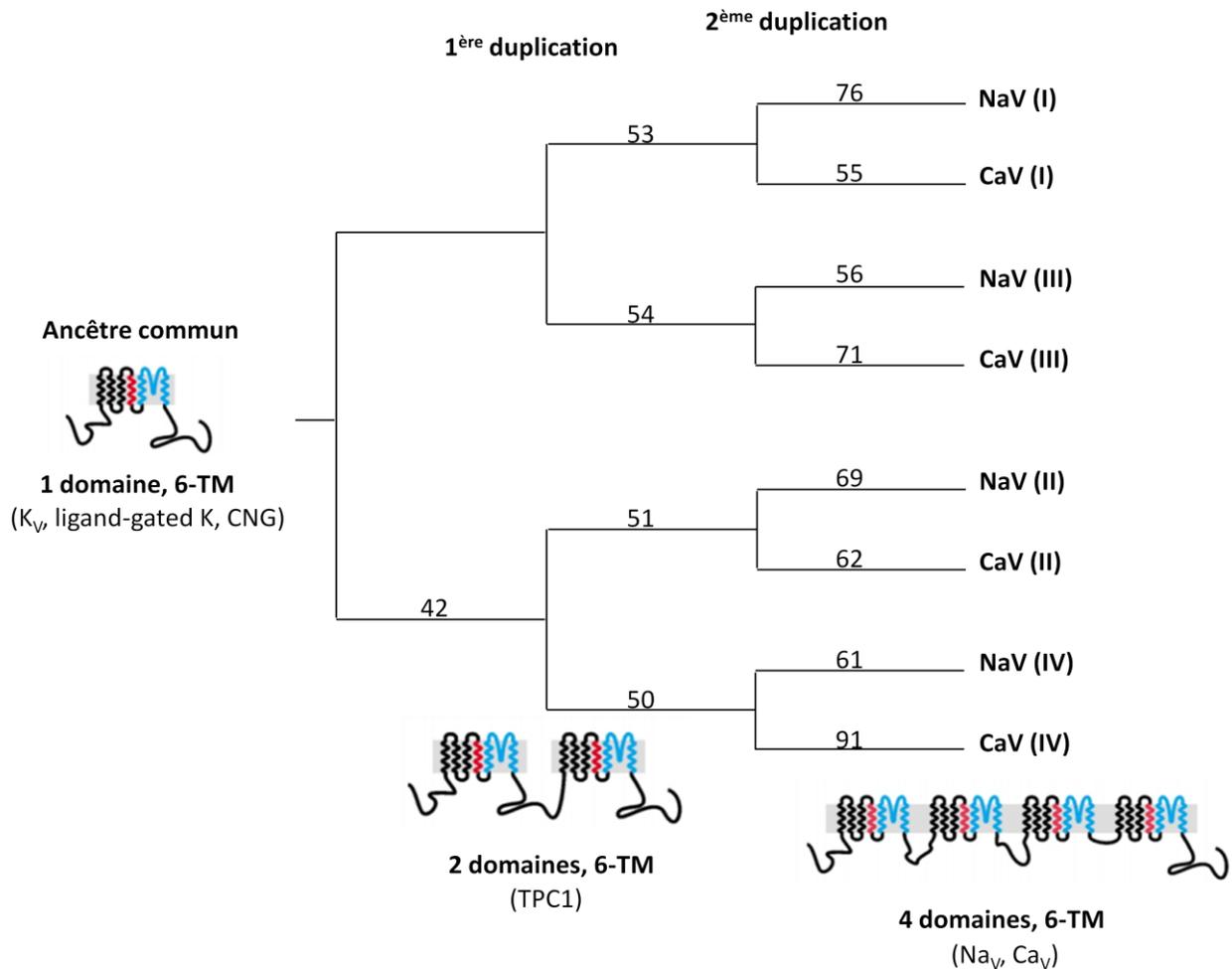
# I. Les canaux sodiques dépendants du voltage

---

Les canaux ioniques peuvent être classés selon les espèces ioniques qui les traversent, tels que les ions sodium, calcium, potassium, les protons et les ions chlorures. Les canaux sodiques dépendants du voltage ( $\text{Na}_v$ ) sont indispensables dans les cellules excitables (neurones et cellules musculaires) puisqu'ils participent à l'initiation et la propagation du potentiel d'action. Ces protéines membranaires s'activent lors d'une dépolarisation membranaire et sont perméables aux ions  $\text{Na}^+$  de façon sélective et, suivant le gradient électrochimique de cet ion, permettent le transport du sodium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Cette activité génère un courant sodique qui est responsable de la phase initiale de dépolarisation membranaire du potentiel d'action dans les cellules excitables.

Des études phylogénétiques montrent qu'à l'échelle de l'évolution, les canaux sodiques seraient les plus récents à être apparus après les canaux calciques dépendants du voltage. En effet, les canaux calciques et sodiques sont organisés en une seule et unique protéine regroupant quatre domaines, contrairement aux canaux potassiques dépendants du voltage où chacun des quatre domaines est constitué par une protéine distincte (Anderson and Greenberg, 2001). Il a été observé une grande homologie de structure entre chacun des quatre domaines des canaux sodiques par rapport aux domaines correspondants des canaux calciques (Hill et al ; 1989). Par ailleurs, il existe une forte homologie entre les séquences des domaines I et III ainsi qu'entre les séquences des domaines II et IV des canaux  $\text{Na}_v$ . Ces observations suggèrent que l'organisation en domaines répétés provient probablement de duplications, à partir d'un ancêtre commun, d'une structure proche de celle des canaux potassiques dépendants du voltage (Strong et al., 1993) (figure 1).

A. Hodgkin et A. Huxley sont les premiers à avoir caractérisé les canaux  $\text{Na}_v$  par leur sélectivité aux ions sodium, par leur activation dépendante du voltage et leurs cinétiques rapides d'activation et d'inactivation (Hodgkin and Huxley, 1952). Ce n'est que bien plus tard, en 1980, que W.A. Catterall et son équipe décrivent les canaux  $\text{Na}_v$  comme un complexe protéique avec une sous-unité principale  $\alpha$  formant le pore du canal et des sous-unités auxiliaires régulatrices  $\beta$  (Beneski and Catterall, 1980). Les nombreuses études sur la sous-unité  $\alpha$  ont permis de démontrer que son expression seule permet d'avoir un canal fonctionnel bien qu'elle soit toujours associée à des sous-unités  $\beta$  de façon endogène (Goldin et al., 1986; Noda et al., 1986).



**Figure 1 :** Arbre phylogénétique montrant les relations entre les domaines des canaux sodiques (Na<sub>v</sub>) et calciques (Ca<sub>v</sub>) dépendants du voltage.

Arbre phylogénétique établi sur l'alignement des séquences en acides aminés. TM : segment transmembranaire. Le chiffre romain entre parenthèses indique le domaine pour la protéine associée. Les nombres indiqués sur les branches horizontales correspondent au nombre de substitutions d'acides aminés à chaque étape de l'évolution structurale des canaux (d'après Anderson and Greenberg, 2001)

## A. La sous-unité principale $\alpha$ : le pore du canal

### 1. Gènes

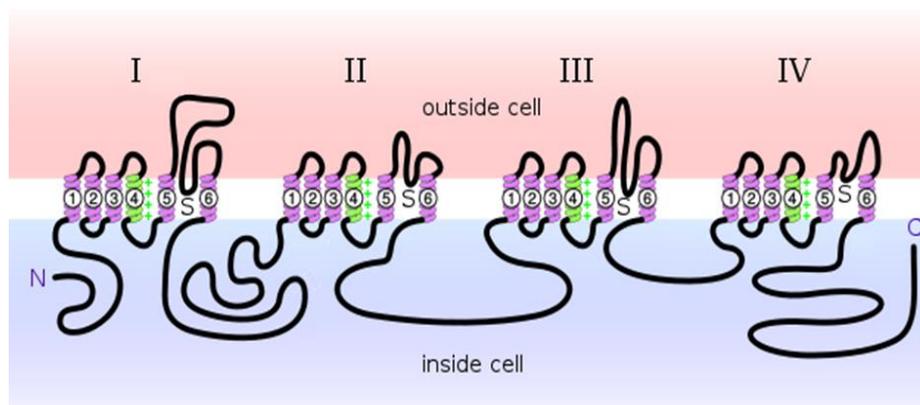
Il a été retrouvé, chez les mammifères dix gènes, neuf codant pour neuf isoformes différentes de  $\alpha\text{Na}_v$  (Na<sub>v</sub>1.1-Na<sub>v</sub>1.9) et un gène codant pour une dixième isoforme particulière (Na<sub>x</sub>) qui ne semble pas dépendante du voltage membranaire (Goldin, 2001; Yu and Catterall, 2003). Suivant la convention de l'International Union of Pharmacologists, une nomenclature des Na<sub>v</sub> a été établie. Prenons comme exemple l'isoforme 1 nommée Na<sub>v</sub>1.1, Na correspond au symbole chimique de l'ion

perméant (Na) suivi en indice, de l'initiale du régulateur physiologique principal, ici le voltage (V). Le premier chiffre 1 correspond à la famille du gène (une seule famille de  $Na_v$  est décrite jusqu'à présent, (Goldin et al., 2000) et le second spécifie l'isoforme du canal. Les gènes codant pour  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  et  $Na_v1.7$  (respectivement *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* et *SCN9A*) sont situés sur le chromosome 2 et montrent des homologies de séquences et de réponses pharmacologiques. Les isoformes  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  sont principalement exprimées dans les neurones du système nerveux central tandis que l'isoforme  $Na_v1.7$  est exprimée dans les neurones du système nerveux périphérique (Goldin, 2001). L'isoforme  $Na_v1.4$ , codée par le gène *SCN4A*, est principalement exprimée dans les muscles squelettiques (Plassart et al., 1994). L'isoforme  $Na_v1.6$ , codée par le gène *SCN8A*, est exprimée dans les neurones du système nerveux central et périphérique (Goldin, 2001; Rush et al., 2005). Ces deux isoformes présentent une forte homologie de séquence (proche de 85%). Cependant, leur localisation chromosomique est différente, *SCN4A* est situé sur le chromosome 11 et *SCN8A* est situé sur le chromosome 15. Ceci pourrait être expliqué, d'après des analyses phylogénétiques, par une apparition plus tardive au cours de l'évolution (Goldin, 2002; Goldin et al., 2000). Un dernier groupe de gènes codant pour  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$  (respectivement *SCN5A*, *SCN10A* et *SCN11A*) est situé sur le chromosome 3. Les isoformes  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$  présentent 75% d'homologie de séquence en acides aminés avec les isoformes  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  et  $Na_v1.7$  mais diffèrent par leur pharmacologie.  $Na_v1.5$  est la principale isoforme cardiaque tandis que  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$  sont majoritairement exprimés dans les neurones sensoriels périphériques (Akopian et al., 1999; Dib-Hajj et al., 2002). La dixième isoforme nommée  $Na_x$ , codée par le gène *SCN7A*, est particulière et assez éloignée des autres isoformes puisqu'elle ne présente que 50% d'homologie de séquence avec la famille de canaux  $Na_v1$ . Ce canal atypique présente des différences en particulier au niveau de motifs très importants tels que le senseur au voltage (segment S4), la porte d'inactivation (boucle reliant les domaines III et IV) et la région du pore. Il semblerait être régulé par la concentration de  $Na^+$  extracellulaire, plutôt que par le voltage membranaire (Grob et al., 2004).

## 2. Structure et propriétés

Les travaux de Hodgkin et Huxley ont permis de définir trois caractéristiques importantes des courants issus des canaux  $Na_v$  : l'activation dépendante du voltage, l'inactivation rapide et la conductance sélective aux ions  $Na^+$  (Hodgkin and Huxley, 1952). De nombreuses études ont permis par la suite de décrire les aspects moléculaires de ces canaux afin de mieux comprendre leurs fonctions.

La sous-unité  $\alpha\text{Na}_v$  est constituée, selon les isoformes, d'environ 2000 acides aminés (260 KDa) et est organisée en quatre domaines répétés (DI – DIV) (Noda et al., 1984) contenant chacun six segments transmembranaires en hélice  $\alpha$  (S1 – S6) (Noda et al., 1984) (figure 2). Une étude de cryomicroscopie électronique réalisée sur des canaux  $\text{Na}_v$  isolés des organes électriques de l'anguille électrique (*Electrophorus electricus*) après chromatographie d'immunoaffinité, révèle un arrangement moléculaire des quatre domaines autour d'un pore central (Sato et al., 2001). Les segments transmembranaires sont reliés entre eux par des boucles extra- ou intracellulaires et les extrémités N- et C-terminales sont situés dans le compartiment intracellulaire (figure 2). Ces boucles et extrémités jouent un rôle spécifique dans les propriétés  $\text{Na}_v$  et sont impliquées dans la régulation de son activité par des signaux intracellulaires. Le pore sélectif du canal est formé par la grande boucle extracellulaire reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine et le segment S4 contrôle la dépendance des canaux au voltage membranaire.



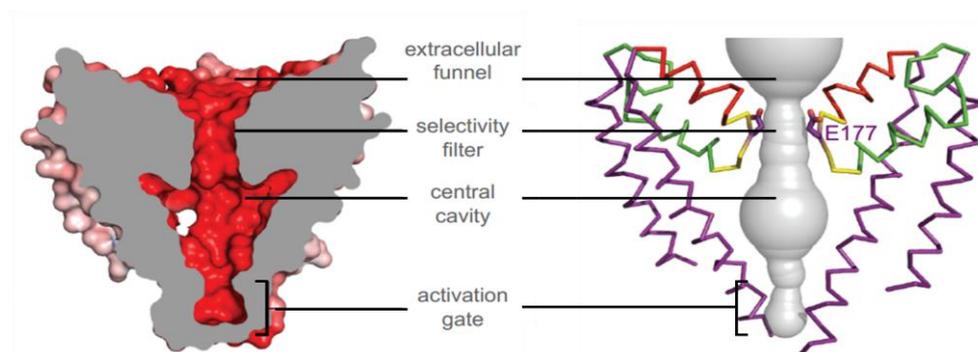
**Figure 2 :** Structure des canaux sodiques dépendants du voltage.

Les canaux  $\text{Na}_v$  sont constitués de quatre domaines (I-IV) contenant chacun six segments transmembranaires (S1-S6). Le segment S4 en vert est le senseur de voltage. La grande boucle extracellulaire reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine constitue le pore sélectif du canal (tiré de Yu and Catterall, 2003).

### a) *Sélectivité et conductance*

Les boucles extracellulaires entre les segments S5 et S6 de chaque domaine (boucle P), en se repliant dans la membrane, forment donc le pore du canal. Certaines études montrent que deux motifs d'acides aminés sont impliqués dans la sélectivité du canal (Noda et al., 1989; Terlau et al., 1991). Le premier est le motif EEDD constitué de deux résidus glutamate (E) et deux résidus aspartate (D) répartis sur chacune des boucles P. Le deuxième est le motif DEKA formé par quatre acides aminés, en position analogue sur la boucle dans chaque domaine, un aspartate dans DI, un glutamate dans DII, une lysine (K) dans DIII et une alanine (A) dans DIV. L'étude récente par diffraction des rayons X

d'un cristal de canaux sodiques bactériens ( $\text{Na}_v\text{Ab}$ ) à une résolution de 2,7 Å a permis d'apporter de nouveaux éléments concernant la structure des canaux sodiques dépendants du voltage (Payandeh et al., 2011). Cette structure est représentée dans la figure 3. Le canal sodique bactérien diffère des canaux sodiques de mammifère par son arrangement en homotétramère et sa différence dans l'inactivation ; mais il reste cependant un modèle très proche des canaux  $\text{Na}_v$ . Cette étude révèle un large vestibule extracellulaire, un étroit filtre de sélectivité contenant les acides aminés décrits précédemment, une large cavité centrale remplie de molécules d'eau (figure 3). Au contraire des canaux potassiques qui ne font pas intervenir de molécules d'eau dans leur filtre de sélectivité et fonctionnent par une interaction directe de coordination entre l'ion potassium et les acides aminés du filtre de sélectivité (Zhou *et al.*, 2001), le transport de sodium par le canal  $\text{Na}_v\text{Ab}$  semble s'effectuer sous forme partiellement hydratée. En effet, le filtre de sélectivité contient quatre résidus glutamate (E177 de chaque domaine) qui interagissent avec l'ion  $\text{Na}^+$  partiellement déshydraté avant d'être réhydraté. Le sodium hydraté peut alors atteindre la cavité centrale et passer dans le compartiment intracellulaire lorsque la porte d'activation est ouverte (Payandeh et al., 2011).



**Figure 3 :** Structure du pore du canal sodique bactérien  $\text{Na}_v\text{Ab}$ .

Le pore du canal  $\text{Na}_v\text{Ab}$  est constitué de quatre zones. Au niveau extracellulaire un premier tunnel qui est suivi du filtre de sélectivité contenant les résidus glutamate (E177) de chaque domaine. Les ions sodium atteignent ensuite la cavité centrale avant de passer dans le compartiment intracellulaire lorsque la porte d'activation est ouverte. (Payandeh et al., 2011).

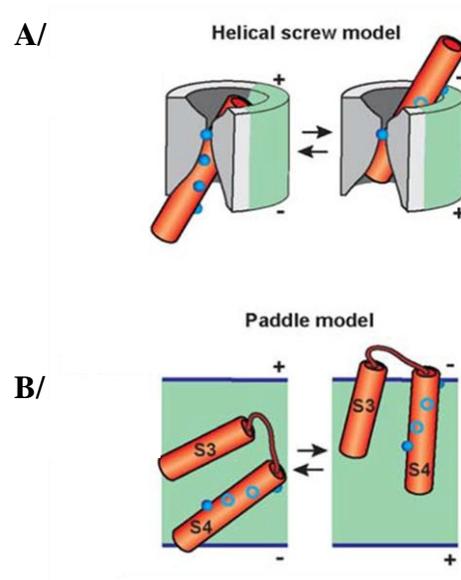
### *b) Dépendance au voltage*

Les canaux sodiques dépendants du voltage sont caractérisés par trois états : un état fermé non perméable, un état activé au cours duquel le canal est perméable aux ions ; et un état inactivé qui est un état non conducteur particulier à partir duquel le canal ne peut pas se ré-ouvrir. Il faudra un certain temps de réactivation à un voltage polarisé pour passer de l'état inactivé à l'état fermé auquel les canaux sont de nouveau disponibles et peuvent être activés lors d'une dépolarisation membranaire.

La dépendance au voltage de l'activation des canaux sodiques a été décrite pour la première fois par Hodgkin et Huxley dont l'hypothèse était un mouvement de trois charges électriques dans un domaine transmembranaire (Hodgkin and Huxley, 1952). Le segment S4, contenant quatre à huit motifs répétés d'acides aminés chargés positivement (arginine) suivis de deux résidus hydrophobes, est responsable de la dépendance au voltage de l'activation des canaux  $Na_v$  (Noda et al., 1984). Il a alors été proposé deux modèles pour expliquer le mouvement de charges au cours de l'activation (voir figure 4). Le premier de "sliding helix" ou de "helical screw" propose que le segment S4 reste en position transmembranaire quel que soit l'état, fermé ou activé, du canal. A l'état fermé, les résidus chargés positivement du segment S4 sont stabilisés par les résidus chargés négativement des segments S2 et S3 adjacents. Lors de l'activation des canaux suite à une dépolarisation membranaire, cette interaction est perdue et provoque un mouvement hélicoïdal du segment S4 (figure 4 A) (Catterall and Yarov-Yarovoy, 2010; Guy and Seetharamulu, 1986). Le second modèle dit "paddle" a été avancé par Jiang et collaborateurs après l'étude par diffraction des rayons X d'un canal potassique bactérien dépendant du voltage ( $K_vAP$ ) (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b). Ils décrivent une structure en épingle à cheveux, formée par les segments S3 et S4 ainsi que la boucle reliant ces deux segments, qui bouge à travers la membrane comme une seule unité. A l'état fermé, le segment S4 surmonté du segment S3 se situe dans la membrane, proche du milieu intracellulaire. Lors d'une dépolarisation membranaire, l'ensemble (S3-S4) va transloquer vers la face externe de la membrane (figure 4 B). La différence principale entre ces deux modèles est le type d'interaction qu'établit le segment S4 au cours de l'activation : des interactions protéiques dans le modèle "sliding helix" ou des interactions lipidiques dans le modèle "paddle".

Indépendamment des deux hypothèses proposées, la position transmembranaire et le mouvement du segment S4 au cours de l'activation des canaux  $Na_v$  a été confirmée par plusieurs études. Certaines ont analysé la fixation d'agents pharmacologiques tels que la toxine IV issue du venin de scorpion *Centruorides suffusus suffusus*, une toxine  $\beta$  de scorpion, qui se fixe sur la boucle entre les segments S3 et S4 du domaine II (Adam and Weiss, 1959; Thomsen et al., 1995) aussi bien à l'état fermé qu'à l'état activé (Cestele and Catterall, 2000; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011). L'équipe de W.A. Catterall a développé l'hypothèse du modèle de "sliding helix" dans l'activation dépendante du voltage des canaux  $Na_v$  et  $Na_vAb$  en réalisant des études par diffraction des rayons X suite à la cristallisation des canaux (Catterall, 2014; Payandeh et al., 2011). Les quatre premières hélices transmembranaires composées des segments S1-S2 et S3-S4 sont organisées en deux structures hélicoïdales de type "épingle à cheveux". Le segment S4 contient quatre résidus arginine (R1 – R4) chargés positivement et qui vont interagir avec différents sites présents sur les segments S1, S2 et S3. Un premier groupement extracellulaire chargé négativement (Extracellular Negative cluster ; ENC)

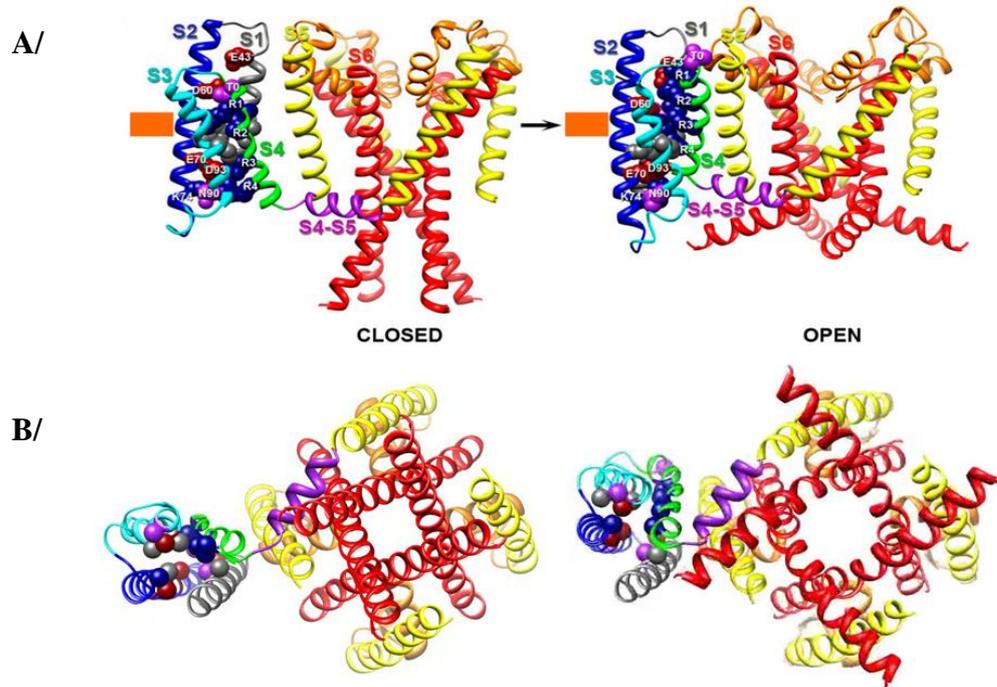
interagit avec R1, R2 et R3 alors que R4 se lie avec un groupement plus proche de la partie intracellulaire (Intracellular Negative Cluster ; INC). La translocation de ces liaisons ioniques lors d'une dépolarisation membranaire permet un mouvement vers l'extérieur du segment S4. Le site HCS (Hydrophobic Constriction Site) stabilise le domaine S1-S4 pendant le mouvement du segment S4 (Payandeh et al., 2011). Des mutations sur des arginines du segment S4 des canaux sodiques  $Na_v$  réduisent l'activation dépendante du voltage, confirmant l'implication de ces charges dans le mécanisme d'activation par le voltage membranaire (Kontis et al., 1997; Stuhmer et al., 1989).



**Figure 4** : Modèles du mécanisme du mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation.

Les segments S3 et S4 sont représentés en orange et la bicouche lipidique en vert. Les quatre premières arginines du segment S4 sont représentées par les sphères bleues pleines lorsqu'elles sont situées devant S4 et vides si elles sont situées derrière S4. A/ le modèle "sliding helix" décrit un mouvement hélicoïdal du segment S4 suite à une dépolarisation membranaire. B/ le modèle "paddle" décrit un mouvement complet d'une structure en épingle à cheveux composée des segments S3 et S4 (tiré de Tombola et al., 2006).

Le changement structural entraînant l'ouverture du pore du canal a été déduit en comparant les structures obtenues après les études par diffraction des rayons X suite à la cristallisation des canaux  $Na_vAb$  et  $K_v1.2$ . Une dépolarisation membranaire provoque un mouvement vers l'extérieur du segment S4 ainsi qu'un enroulement des segments S1, S2 et S3 autour de S4. Ces mouvements exercent une torsion sur la boucle entre S4 et S5 qui va bouger dans un plan parallèle à la membrane et va induire une flexion et une torsion des segments S5 et S6 pour enfin aboutir à l'ouverture du pore, tel un diaphragme (figure 5).



**Figure 5 :** Mécanisme d'ouverture du pore du canal Na<sub>v</sub>Ab.

Seul un des quatre domaines est représenté avec ses 6 segments pour plus de lisibilité. Pour les autres domaines, seuls les segments S5 et S6 sont représentés. Les segments S5 (en jaune) et les segments S6 (en rouge) issus des quatre domaines constituent le pore du canal. La boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 est en violet et les segments S1 à S4, constituant le domaine sensible au voltage (VSD), ont une couleur individuelle. Les modélisations à gauche, représentent le canal dans un état fermé alors que les modélisations de droite représentent le canal dans un état ouvert. Ces deux états sont représentés par A/ une vue latérale transmembranaire et par B/ une vue intracellulaire (Tiré de (Payandeh et al., 2011)).

En plus d'une activation dépendante du potentiel de membrane, les canaux sodiques Na<sub>v</sub> sont caractérisés par une inactivation en deux temps avec une première phase d'inactivation rapide et une deuxième phase d'inactivation plus lente. L'inactivation rapide du canal est due à un mécanisme dit "boule et chaîne" ("ball and chain"). Cette structure "boule et chaîne" serait constituée par la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV qui se replie vers l'intérieur du pore en se fixant sur une région nommée "docking site" (site accepteur) (Armstrong, 1981) obstruant ainsi le pore du canal et bloquant sa conductance (West et al., 1992). Un motif hydrophobe, situé sur la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV, constitué en particulier d'une isoleucine, d'une phénylalanine et d'une méthionine (IFM), est nécessaire pour maintenir la porte d'inactivation fermée (Kellenberger et al., 1997; Vassilev et al., 1988). Seule une étude par RMN décrit le domaine IFM comme une hélice  $\alpha$  rigide précédée par deux boucles responsables du dépliement du motif IFM et d'un résidu thréonine vers l'intérieur de pore du canal (Rohl et al., 1999). Ce mécanisme d'inactivation rapide n'est pas présent dans le canal sodique bactérien Na<sub>v</sub>Ab tétramérique (bien

qu'il y ait une inactivation). La phase d'inactivation rapide est suivie d'une composante d'inactivation lente qui permet l'inactivation totale des canaux  $Na_v$ . Le mécanisme moléculaire est encore moins bien décrit que l'inactivation rapide. Le filtre de sélectivité et le segment S6 du segment N-terminal semblent être les structures impliquées (Chen et al., 2006; Pavlov et al., 2005).

### 3. Pharmacologie et régulation

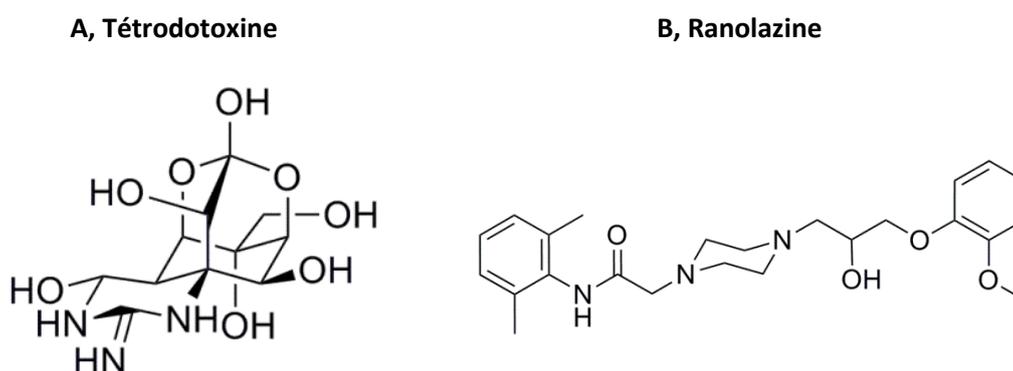
#### a) Pharmacologie des canaux $Na_v$

De nombreuses molécules sont décrites dans la littérature pour moduler l'activité du canal  $Na_v$ . Certaines de ces molécules sont des toxines naturelles retrouvées chez différentes espèces animales (scorpion, serpent, poisson ...) ou végétales (Liliacées, Ranunculacées, Ericacées, etc.) ; d'autres sont des molécules de synthèse utilisées pour le traitement de pathologies comme les molécules anti-arythmiques, anti-épileptiques ou les anesthésiques locaux. Jusqu'à présent, neuf sites de fixation de toxines ou d'agents pharmacologiques ont été décrits sur la sous-unité  $\alpha$  des  $Na_v$  (Anger et al., 2001; Cestele and Catterall, 2000). On définit deux groupes de bloqueurs en fonction de leur mode d'action : ceux qui bloquent le pore et inhibent directement le courant (sites de fixation 1 et 9) ; et ceux qui modulent l'activation ou l'inactivation (sites de fixation 2 à 8) (Anger et al., 2001).

Au cours de cette thèse, nous avons principalement utilisé deux toxines : la tétrodotoxine (TTX ; figure 6 A) qui bloque le pore du canal et par conséquent le courant sodique et la ranolazine qui est initialement décrite pour inhiber le courant persistant (figure 6 B). La tétrodotoxine (TTX) est une molécule hydrophile naturelle puissante (figure 6 A) produite par des bactéries (*Vibrio fischeri*, *Pseudalteromonas tetraodonis*, *Vibrio altermonas* et *Vibrio alginolyticus*) présentes dans certains organes (foie, ovaires, yeux, tube digestif) de poissons globes de la famille des Tetraodontidae (Fuhrman, 1967). Elle a également été retrouvée chez certains mollusques, crabes, pieuvres ou encore grenouilles (Hwang et al., 1991; Mebs and Schmidt, 1989). La TTX bloque de manière très spécifique les canaux  $Na_v$  en interagissant avec le site récepteur 1 des canaux  $Na_v$ . Une classification des neuf isoformes de  $Na_v$  a été établie suivant leur sensibilité à la TTX :  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$ , qui sont bloquées par des concentrations de l'ordre du micromolaire de TTX ( $IC_{50}$  comprise entre 3 et 45  $\mu$ M suivant les isoformes), sont nommées  $Na_v$  TTX-résistantes (TTX-R).  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.6$  et  $Na_v1.7$  sont bloquées par des concentrations plus faibles de l'ordre du nanomolaire de TTX ( $IC_{50}$  comprise entre 10 et 25 nM suivant les isoformes) et sont donc nommés  $Na_v$  TTX-sensibles (TTX-S). Certains résidus présents sur la boucle P entre les segments S5 et S6 (du domaine I) des canaux  $Na_v$  sont particulièrement importants pour la sensibilité à la TTX. En effet, sur l'isoforme  $Na_v1.5$ , la substitution d'une tyrosine en position 374 par une cystéine (Y374C) entraîne une

augmentation de la sensibilité à la TTX ( $K_d$  de 950 nM en condition contrôle contre 1,3 nM avec la mutation) alors qu'une substitution d'une arginine en position 377 par une asparagine (R377N) entraîne une réduction de la sensibilité à la TTX ( $K_d$  de 950 nM en condition contrôle contre 7580 nM avec la mutation) (Satin et al., 1992). De même pour les isoformes  $Na_v1.8$  et  $Na_v1.9$ , la substitution d'une sérine en position 356 par une phénylalanine (équivalente à la position 374 de  $Na_v1.5$ ), augmente la sensibilité à la TTX ( $IC_{50}$  de  $59,4 \pm 7,2 \mu M$  à  $2,83 \pm 0,36$  nM) (Sivilotti et al., 1997). Le groupe guanidine de la TTX interagit avec les deux résidus acides de la séquence DEKA de  $Na_v$  (séquence impliquée dans la sélectivité ionique du canal) et bloque ainsi le pore du canal. Ce blocage rapide est néanmoins réversible en quasi-totalité (Chen and Chung, 2014; Heinemann et al., 1992).

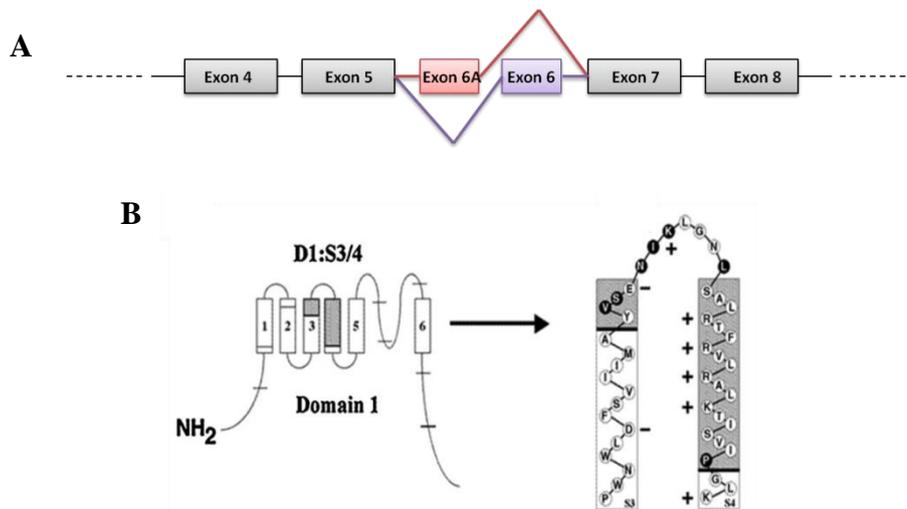
La ranolazine (figure 6 B) est un dérivé de pipérazine. Tous les mécanismes d'action de la ranolazine ne sont pas encore élucidés. Elle a été initialement décrite comme un inhibiteur des courants sodiques en diminuant le courant de pic ( $IC_{50} = 135 \mu M$  ; Fredj S. et al., 2006) mais en inhibant préférentiellement les courants sodiques persistants souvent générés dans des conditions ischémiques/hypoxiques ( $IC_{50} = 15 \mu M$  ; (Fredj et al., 2006). Une étude réalisée avec l'isoforme  $Na_v1.5$  montre que la ranolazine se fixe sur le même site récepteur 9 que les anesthésiques locaux ou les molécules anti-arythmiques, c'est-à-dire sur le segment S6 du domaine IV au niveau des résidus phénylalanine 1764 et tyrosine 1771 (Ragsdale et al., 1994). La ranolazine est utilisée en clinique dans différents pays (États-Unis, Allemagne, Japon...) où elle est prescrite pour le traitement des angines de poitrine chroniques mais n'est pas utilisée en thérapeutique en France.



**Figure 6 :** Structures moléculaires des deux agents pharmacologiques utilisés dans cette étude : la tétrodotoxine (A/) et la ranolazine (B/)

## b) Régulation des canaux $Na_v$

Peu d'études se sont intéressées à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du gène *SCN5A* codant pour l'isoforme cardiaque  $Na_v1.5$ . Il existe de nombreux variants d'épissage parmi les isoformes de  $Na_v1.5$ . L'existence de promoteurs alternatifs, associés aux épissages alternatifs des exons, et de régions 5' non traduites (5'UTR) conduisent à l'expression de différents variants de  $Na_v1.5$  (Rook et al., 2012; van Stuijvenberg et al., 2010). Un variant d'épissage particulier codant pour une isoforme cardiaque néonatale ( $nNa_v1.5$ ) serait exprimé au cours du développement. C'est également cette isoforme qui est exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Fraser et al., 2005). Dans la séquence codant pour l'isoforme néonatale de  $Na_v1.5$  l'exon 6 de l'isoforme adulte est remplacé par un exon alternatif nommé 6A (figure 7 A) (Onkal et al., 2008). Cela entraîne une substitution de 7 acides aminés situés sur la boucle reliant les segments S3 et S4 du domaine I de la protéine  $Na_v1.5$  néonatale (figure 7 B).



**Figure 7 :** Différences moléculaires entre l'isoforme néonatale et l'isoforme adulte du canal  $Na_v1.5$ .

A, Diagramme schématique représentatif du gène *SCN5A* et montrant l'épissage alternatif de l'exon 6 (exon 6A : forme néonatale). B, Schéma du domaine I de la protéine  $Na_v1.5$  néonatale. Les sept acides aminés différents par rapport à l'isoforme adulte sont situés sur la séquence des segments S3 et S4 et sont représentés par un cercle noir (B, tiré de Onkal et al. 2008).

L'activité de l'isoforme néonatale de  $Na_v1.5$  diffère de l'isoforme adulte : l'activation dépendante du voltage est décalée vers des potentiels plus positifs, les cinétiques d'activation et d'inactivation sont plus lentes, et le flux transitoire de sodium est potentiellement plus important (Onkal et al., 2008). De plus, il semblerait que la lysine en position 211 ait un rôle important dans ces changements électrophysiologiques puisque sa mutation par un résidu aspartate abolit complètement les différences entre l'isoforme néonatale et l'isoforme adulte de  $Na_v1.5$  (Onkal et al., 2008). De récentes études montrent une régulation de la transcription du gène *SCN5A* sous la dépendance de

des protéines TBX (T-box transcription factor) dans les cardiomyocytes (Arnolds et al., 2012). TBX3, en se fixant en aval du gène *SCN5A*, inhibe sa transcription, alors qu'à l'inverse, la fixation de TBX5 la stimule (van den Boogaard et al., 2012). D'autres études réalisées sur le promoteur de *SCN5A* décrivent la présence de séquences correspondant à des éléments régulateurs cis (cis-Regulatory Elements, CRE) (Yang et al., 2004). Cependant, la nature précise des facteurs de transcription pouvant se fixer aux séquences CRE et leurs sites de liaison respectifs ne sont pas encore déterminés.

Une fois la protéine  $\text{Na}_v$  traduite, certains facteurs interviennent dans la régulation de son adressage membranaire. La protéine  $\text{Na}_v1.5$  possède des motifs de rétention dans le réticulum endoplasmique RxR (R pour arginine et x pour un quelconque acide aminé) (Boyle et al., 2006) présents sur la boucle intracellulaire entre le domaine I et II (Allouis et al., 2006). La phosphorylation des sérines (Ser525 et Ser528) adjacentes au motif RxR par une PKA pourrait masquer le signal de rétention et permettre l'export de  $\text{Na}_v1.5$  du réticulum endoplasmique vers la membrane cellulaire (Zhou J et al. 2002). Un second motif, DXE (Asp-x-Glu, x étant n'importe quel acide aminé) situé à l'extrémité du domaine C-terminal (séquence PDRDRESIV) de  $\text{Na}_v1.5$ , pourrait être un signal d'export de  $\text{Na}_v1.5$  du réticulum endoplasmique (Barlowe, 2003 ; Herfst et al., 2003). Enfin, le canal  $\text{Na}_v1.5$  possède un motif de liaison au niveau C-terminal avec un domaine PDZ permettant son association avec trois protéines PSD-95, SAP97 et Zo1. L'interaction avec ces protéines pourrait moduler le transport de  $\text{Na}_v1.5$  du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Herfst, 2003). Très peu de choses sont connues concernant le transport de  $\text{Na}_v1.5$  de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Dans un modèle d'expression (cellules HEK-293) ou sur des cardiomyocytes de chien, une étude révèle une expression plus importante de  $\text{Na}_v1.5$  au niveau du réticulum endoplasmique que dans l'appareil de Golgi (Zimmer et al., 2002). Les auteurs de cette étude ont alors émis l'hypothèse que le mécanisme de transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pourrait servir à une étape de contrôle de qualité de protéines fonctionnelles à la membrane.

Les modifications post-traductionnelles de  $\text{Na}_v1.5$  régulent les aspects fonctionnels de la protéine. Différents acteurs ont été décrits dans ces régulations telles que les PKA (protéines kinases AMPc dépendantes) et les PKC (protéines kinases activées par une augmentation de diacylglycérol ou de  $\text{Ca}^{2+}$ ) mais également certaines tyrosines kinases.

Dans des cardiomyocytes ou en système d'expression, il a été décrit une augmentation du courant sodique  $\text{Na}_v1.5$  suite à une stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Frohnwieser et al., 1997; Schreibmayer et al., 1994). Cette augmentation du courant sodique (d'environ 70 %) suite à l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est inhibée de près de 50 % en présence d'un inhibiteur de PKA (Lu et al., 1999). Deux sites potentiels de phosphorylation ont été identifiés : un premier sur

la sérine 525 et un second sur la sérine 528 de la boucle intracellulaire située entre les domaines I et II du canal (Murphy et al., 1996). En effet, la mutation de ces deux sérines en alanines diminue le courant sodique induit par la stimulation de la PKA. Cependant, la mutation de ces deux sérines par des résidus glutamates permet toujours l'augmentation du courant en réponse à l'activation de la PKA. Ceci suggère que la phosphorylation de ces deux sérines est nécessaire mais pas suffisante pour expliquer cette augmentation du courant (Zhou et al., 2002). Nous avons vu précédemment que la phosphorylation de ces deux mêmes sérines était impliquée dans l'export de  $\text{Na}_v1.5$  du réticulum endoplasmique et son transport vers la membrane cellulaire (Zhou et al., 2002). L'augmentation du courant sodique suite à la stimulation de la PKA pourrait donc être due à une augmentation de l'adressage de canaux  $\text{Na}_v1.5$  à la membrane. Cette hypothèse est appuyée par des expériences réalisées en configuration canal unitaire qui montrent une hausse du nombre de canaux  $\text{Na}_v$  fonctionnels à la membrane suite à l'application d'un peptide dérivé de la sous-unité  $\alpha$  des protéines  $G_s$  ( $G_s\alpha$ ) (Lu et al., 1999).

Contrairement à l'activation de la PKA, l'activation des PKC conduit à une diminution de l'amplitude du courant sodique  $\text{Na}_v1.5$  dans des cardiomyocytes ou en système d'expression (Murray et al., 1997; Qu et al., 1994; Qu et al., 1996). L'activation de la PKC semble cependant augmenter le courant sodique persistant (Tateyama et al., 2003). Des études fonctionnelles avec la forme sauvage de  $\text{Na}_v1.5$  ainsi qu'avec différents mutants ont démontré l'implication de la sérine en position 1503 dans la phosphorylation de  $\text{Na}_v1.5$  par la PKC (Murray et al., 1997). Cependant, l'effet de la PKC sur la phosphorylation et l'activité de  $\text{Na}_v$  semble dépendre de l'isoforme de  $\text{Na}_v$  considérée (Ko et al., 2006; Murray et al., 1997; Schreibmayer et al., 1991). Deux études récentes suggèrent que dans certaines pathologies cardiaques (syndrome de Brugada ou de mort subite chez l'enfant) la modulation de l'activité du canal  $\text{Na}_v1.5$  par la protéine glycérol-3-phosphate déshydrogénase 1-Like (GPD1L) impliquerait la PKC ; mais des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de la PKC (Liu et al., 2009; Valdivia et al., 2009).

La phosphorylation des canaux  $\text{Na}_v$  peut également se faire par les protéines tyrosines kinases puisque l'activation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui est une protéine à activité tyrosine kinase intrinsèque, augmente le courant  $I_{\text{Na}}$  (Liu et al., 2007). L'activité de  $\text{Na}_v1.5$ , exprimée dans des cellules HEK-293, est modifiée par l'application d'insuline (récepteur à l'insuline endogène des cellules HEK-293). L'insuline décale la courbe de disponibilité des canaux  $\text{Na}_v$  vers des potentiels plus dépolarisés mais cet effet n'apparaît plus lorsque les tyrosines kinase de la famille des Src sont inhibées (Ahern et al., 2005). La Kinase Fyn, qui fait partie de la famille des Kinases Src, est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de  $\text{Na}_v1.5$ . En effet, la co-expression de  $\text{Na}_v1.5$  et de la

Kinase Fyn décale, de la même façon que précédemment, la courbe de disponibilité des canaux  $\text{Na}_v$ . Seule la mutation de la tyrosine (en position 1495) située sur la boucle entre les domaines III et IV provoque la disparition de cette altération (Ahern et al., 2005). Ce même résidu tyrosine est également impliqué dans l'interaction entre  $\text{Na}_v1.5$  et le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  pendant l'inactivation (Sarhan et al., 2009). La tyrosine phosphatase PTPH1 interviendrait dans la déphosphorylation de  $\text{Na}_v1.5$  (Jespersen et al., 2006). L'acide aminé sur la séquence protéique de  $\text{Na}_v1.5$  associé à l'effet de PTPH1 n'a pas été identifié mais il semblerait que le domaine PDZ de la partie C-terminale du canal soit nécessaire pour l'activité de cette phosphatase.

Il a récemment été montré dans un modèle d'expression (HEK-293), ainsi que sur des tissus cardiaques humains (biopsies du myocarde de patients ayant subi des crises cardiaques), que les canaux  $\text{Na}_v1.5$  pouvaient être méthylés sur plusieurs résidus arginine (R513, R526 et R680), grâce à l'activité d'arginines méthyl-transférases (AMT-3 et AMT-5) (Beltran-Alvarez et al., 2011 ; 2013). La méthylation de  $\text{Na}_v1.5$  augmente son expression à la membrane plasmique et par conséquent augmente la densité du courant sodique. Ces méthylations semblent importantes puisque les mutations de ces résidus arginine de la protéine  $\text{Na}_v1.5$  entraînent une diminution du courant sodique et sont associées à des arythmies cardiaques (syndrome de Brugada, syndrome de mort subite chez l'enfant) (Beltran-Alvarez et al., 2011 ; 2013). La méthylation de l'arginine 526 (R526) semble être la modification post-traductionnelle majeure par rapport aux autres méthylations des résidus arginine. En effet, cette méthylation semble être la forme dominante de  $\text{Na}_v1.5$  dans le tissu cardiaque de patients ayant subi une crise cardiaque (Beltran-Alvarez et al., 2014). De plus, la mutation R526H est associée au syndrome de Brugada (Aiba et al. 2014). Par ailleurs, une acétylation au niveau du domaine N-terminal de  $\text{Na}_v1.5$  (résidus non déterminés) a également été décrite. Il semblerait que la forme acétylée de  $\text{Na}_v1.5$  soit la plus abondante retrouvée dans le tissu cardiaque de patients ayant subi une crise cardiaque (Beltran-Alvarez et al., 2014).

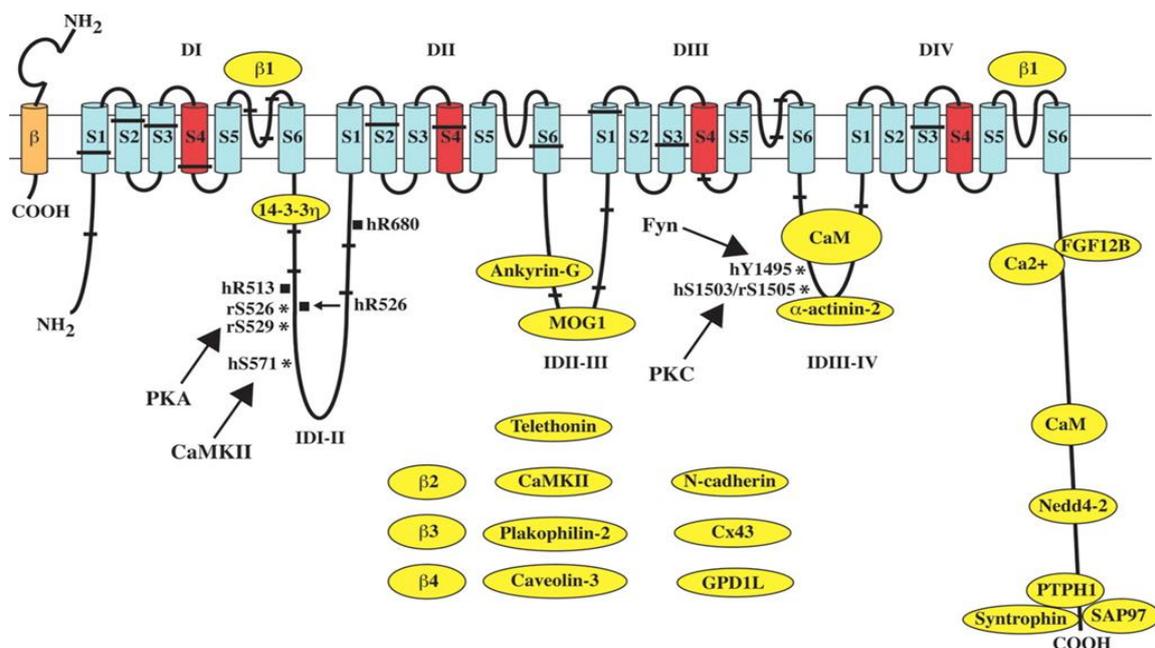
Il est de plus en plus admis que les canaux  $\text{Na}_v$  sont également régulés par le calcium directement, ou indirectement via la calmoduline (CaM) ou encore la protéine kinase  $\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$  dépendante de type II (CaMKII). La calmoduline interagit directement avec  $\text{Na}_v1.5$  au niveau C-terminal via le domaine IQ (Isoleucine-Glutamine) (Deschenes et al., 2002; Mori et al., 2003) (figure 8). Deux régions d'interaction avec la CaM ont été identifiées : la première se situe sur la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV, la seconde est moins bien caractérisée et semblerait dépendante du motif FFI (en position 1520) et YY (position 1494 et 1495) (Tan et al., 2002). De nombreux résultats très différents ont été rapportés concernant les conséquences fonctionnelles de l'interaction entre  $\text{Na}_v1.5$  et la CaM. Une première étude en système d'expression (TSA201) montre qu'un peptide

antagoniste de la liaison de la calmoduline provoque un décalage de la disponibilité de +6 mV et diminue l'inactivation (Tan et al., 2002). Une autre étude n'observe pas d'effet de la CaM sur Na<sub>v</sub>1.5 lorsque Na<sub>v</sub>1.5 est exprimé dans des cellules HEK-293 (Deschenes et al., 2002).

Indépendamment de la calmoduline, Na<sub>v</sub>1.5 peut également être régulé directement par le calcium intracellulaire via le domaine EF-Hand like (Wingo et al., 2004) mais là encore le mécanisme précis n'est pas connu. Il est seulement décrit qu'une augmentation du calcium intracellulaire réduit la densité de courant sodique dans des myocytes ventriculaires sans effet sur la dépendance au voltage de l'activation ou de la disponibilité (Casini et al., 2009).

Enfin, la protéine kinase II Ca<sup>2+</sup> / CaM dépendante (CaMKII) semble également réguler Na<sub>v</sub>1.5 (figure 8). Cinq sites d'interaction avec Na<sub>v</sub>1.5 ont été décrits. Ils sont tous situés sur la boucle intracellulaire entre le domaine I et II (Ashpole et al., 2012). Les propriétés régulées ne sont pas encore clairement élucidées mais il semblerait que Ca<sup>2+</sup> / CaM et CaMKII décalent la disponibilité des canaux Na<sub>v</sub>1.5 vers des potentiels plus dépolarisés et seule CaMKII augmente le courant persistant (Aiba et al., 2010; Wagner et al., 2006). Les protéines Na<sub>v</sub>1.5 et la CaMKII sont colocalisées et leur co-immunoprécipitation révèle qu'elles ont une grande proximité. Il a récemment été montré que cette régulation sur le courant persistant était dépendante de l'activation d'espèces réactives de l'oxygène (Wagner et al., 2011).

De nombreuses études ont caractérisé les interactions de Na<sub>v</sub> avec d'autres protéines pouvant moduler son activité (Figure 8).



**Figure 8 :** Représentation schématique de Na<sub>v</sub>1.5 et de ses partenaires protéiques.

La protéine Na<sub>v</sub> comporte quatre domaines (DI-DIV) comprenant six segments transmembranaires (S1-S6). Le segment S4, sensible au voltage, est en rouge. Une sous-unité auxiliaire β est représentée en orange. Les sites de phosphorylation sont représentés avec un astérisque et les kinases impliquées sont indiquées à côté. Les sites de méthylation sont représentés par des carrés. h : résidus sur le canal humain ; r : résidus sur le canal de rat. (Tiré de (Rook et al., 2012)).

Les ankyrines sont des protéines dites d'échafaudage qui assurent les liaisons entre des protéines membranaires et le cytosquelette d'actine. L'ankyrine G (General ou Giant, ankyrine la plus présente, exprimée dans les cellules épithéliales et les neurones) interagit directement avec Na<sub>v</sub> via la boucle intracellulaire entre les domaines II et III (Lemaitte et al., 2003) et cette liaison est indispensable pour la localisation membranaire des différentes isoformes de Na<sub>v</sub> (Lowe JS et al. 2008). En effet, une mutation naturelle (E1053K) de Na<sub>v</sub>1.5 au niveau de ce domaine inhibe la liaison de l'ankyrine G et par conséquent l'expression à la membrane du canal dans les cardiomyocytes (Mohler et al., 2004). L'effet d'une liaison de l'ankyrine B (broad, large distribution tissulaire, exprimée dans les muscles et le cerveau) à Na<sub>v</sub>1.5 est discuté : une première étude montre que l'inhibition de l'expression de l'ankyrine B n'a pas d'effet sur le canal Na<sub>v</sub> dans des cardiomyocytes de rat (Lowe et al., 2008), alors qu'une seconde équipe décrit une diminution de la densité de courant I<sub>Na</sub> dans des cardiomyocytes néonataux issus de souris génétiquement modifiées pour ne plus exprimer le gène de l'ankyrine B (Chauhan et al., 2000). La liaison de l'ankyrine-R (Restricted, distribution tissulaire limitée, exprimée dans les érythrocytes, les neurones et les cellules musculaires) a été plus étudiée sur les canaux sodiques exprimés dans les neurones (n'implique pas l'isoforme Na<sub>v</sub>1.5). Grâce à la β-spectrine III (un tétramère capable de s'associer par ses extrémités intracellulaires aux filaments d'actine et permet l'ancrage du cytosquelette à des protéines membranaires) l'ankyrine-R est maintenue à la membrane

plasmique des neurones de Purkinje. Cette interaction de l'ankyrine-R et de la  $\beta$ -spectrine III est cruciale pour l'activité des canaux sodiques (Clarkson et al., 2014). D'autres protéines régulent également l'adressage de  $\text{Na}_v1.5$  à la membrane plasmique. SAP97 (Synapse-associated protein de 97 kDa) est une protéine de la famille des MAGUK (membrane-associated guanylate kinases) ayant de nombreux sites d'interactions protéiques (dont trois domaines PDZ) et dont la fonction principale est le transport de protéines membranaires du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Sans et al., 2001). Dans des cardiomyocytes de souris, la protéine SAP97 colocalise avec  $\text{Na}_v1.5$  et régule son adressage membranaire vers les disques intercalaires (Petitprez et al., 2011) alors qu'une localisation de  $\text{Na}_v1.5$  au niveau de la membrane latérale de cardiomyocytes est favorisée par une interaction avec la syntrophine (Ou et al., 2003). Tout comme la SAP97, les syntrophines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) se lient aux protéines  $\text{Na}_v$  et favorisent leur adressage à la membrane plasmique (Shao et al., 2009). Elles contiennent un domaine PDZ qui interagit avec les trois derniers résidus du domaine intracellulaire C-terminal de  $\text{Na}_v1.5$  (Haenggi and Fritschy, 2006). Une mutation (A390V) du gène codant pour la syntrophine  $\alpha1$ , retrouvée chez des patients atteints de syndrome de QT long ou encore du syndrome de mort subite chez l'enfant, est associée le plus souvent à un gain de fonction de la protéine  $\text{Na}_v1.5$  (augmentation du courant de pic et du courant persistant) via la S-nitrosylation du canal par l'oxyde nitrique (Ahern et al., 2000; Cheng et al., 2009; Ueda et al., 2008).

D'autres facteurs très exprimés dans le tissu cardiaque tels que la Plakophiline-2 (Sato et al., 2009), MOG1 (Wu et al., 2008), la N-cadhérine et la connexine 43 (Malhotra et al., 2004) participent à la régulation de  $\text{Na}_v1.5$ . L'interaction des canaux  $\text{Na}_v$  avec ces protéines semble indispensable à son adressage et sa localisation membranaire. L'ankyrine G, la plakophiline et la connexine-43 peuvent s'associer et interagir en macrocomplexe avec  $\text{Na}_v1.5$  (Sato et al., 2011). L'inhibition de l'expression de la plakophiline-2 diminue la densité de courant sodique, induit un décalage vers des potentiels plus hyperpolarisés de la disponibilité et augmente le temps de réactivation des canaux  $\text{Na}_v1.5$  (Sato et al., 2009). La protéine MOG1 est également un co-facteur important pour la fonction de  $\text{Na}_v1.5$ . La co-expression de ces deux protéines dans des cellules HEK-293 augmente la densité de courant sodique (de 2,5 fois) par rapport à l'expression seule de  $\text{Na}_v1.5$ . De façon similaire, la surexpression de MOG1 dans des cardiomyocytes néonataux conduit à une augmentation du même ordre. La protéine MOG1 n'a pas d'effet sur la conductance unitaire des  $\text{Na}_v$  mais favoriserait l'adressage de  $\text{Na}_v1.5$  vers la membrane plasmique (Wu et al., 2008).

Certaines études portent sur la caractérisation du recyclage des canaux  $\text{Na}_v$ . Il semble que la protéine Nedd4 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4) de la famille des ubiquitines ligases, intervienne dans ce processus. Les deux domaines WW 2 et 3 (Trp- Trp) de Nedd4

peuvent se lier au motif PY (Pro-Tyr) situé sur le fragment C-terminal intracellulaire de toutes les isoformes de  $\text{Na}_v$  à l'exception de  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.9$  (Fotia et al., 2004; Harvey et al., 1999). Plusieurs études sur des modèles d'expression (ovocytes de *Xenopus*, HEK-293) ou sur des cardiomyocytes ventriculaires de souris ont permis de montrer que Nedd4, en se liant au motif PY de  $\text{Na}_v1.5$ , ubiquitine la protéine et entraîne une diminution de son expression à la membrane (Abriel et al., 2000; Rougier et al., 2005; van Bemmelen et al., 2004).

Enfin, dans le complexe multiprotéique contenant les canaux  $\text{Na}_v$ , se trouvent une ou plusieurs sous-unités auxiliaires  $\beta$  dites régulatrices de la sous-unité principale  $\alpha \text{Na}_v$ . Cinq sous-unités ( $\beta1$ ,  $\beta1B$ ,  $\beta2$ ,  $\beta3$  et  $\beta4$ ) ont été clonées et caractérisées jusqu'à présent et sont décrites dans le chapitre suivant.

#### **4. Rôles de la sous-unité principale $\alpha \text{Na}_v$ dans les cellules non excitables**

Indépendamment de leurs rôles dans les cellules excitables où ils sont responsables de la dépolarisation et de la propagation du potentiel d'action, les canaux sodiques dépendants du voltage sont exprimés de façon physiologique ou pathologique dans de nombreuses cellules non excitables dans lesquelles ils pourraient être impliqués dans d'autres fonctions cellulaires.

Dans le tissu nerveux, les canaux sodiques sont exprimés dans les cellules neuronales où ils participent à l'excitabilité cellulaire mais sont également exprimés dans des cellules non neuronales adjacentes (Korotzer and Cotman, 1992; Norenberg et al., 1994). Par immunomarquage, les isoformes  $\text{Na}_v1.1$  et  $\text{Na}_v1.6$  ainsi que  $\text{Na}_v1.5$  ont été identifiées dans des cellules microgliales (Black et al., 2009).  $\text{Na}_v1.6$  est l'isoforme la plus exprimée (Krzemien et al., 2000; Tzoumaka et al., 2000). Les canaux sodiques modifient de multiples fonctions des cellules microgliales activées suite à une lésion tissulaire. Dans ces cellules, l'inhibition pharmacologique des canaux  $\text{Na}_v$  provoque une diminution de la phagocytose, une diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) ainsi qu'une diminution de la migration et de l'invasivité cellulaire (Black and Waxman, 2012). Dans un modèle murin de sclérose en plaques (l'encéphalite allergique expérimentale, EAE, est une affection auto-immune mimant la sclérose en plaques chez la souris) il est décrit qu'une augmentation de l'expression de  $\text{Na}_v1.6$  contribue à ces mécanismes moléculaires (phagocytose, migration, libération de cytokines) conduisant à l'activation des cellules microgliales (Craner et al., 2005).

Les isoformes  $\text{Na}_v1.5$  et  $\text{Na}_v1.6$  sont exprimées dans des macrophages dans lesquels elles présentent des localisations subcellulaires assez différentes. Le canal  $\text{Na}_v1.5$  est localisé dans les endosomes

tardifs et les phagosomes où il régule leur acidification suite à l'activation des macrophages par les lipopolysaccharides (Carrithers et al., 2007). L'isoforme  $Na_v1.6$  contribue au contrôle de l'invasivité cellulaire en régulant la formation des podosomes de macrophages et des invadopodes de cellules de mélanome via un remodelage du cytosquelette d'actine (Carrithers et al., 2009).

Dans les cellules dendritiques humaines, l'activité de l'isoforme  $Na_v1.7$  maintient un potentiel de membrane dépolarisé ( $-8,7 \pm 1,5$  mV) et permet de réguler leur activation. L'activité des canaux  $Na_v1.7$  participe également à la migration des cellules dendritiques et régule leur sécrétion de cytokines (augmentation de la sécrétion de  $TNF-\alpha$  et d'IL-10 en présence de TTX). Après l'activation et la maturation des cellules dendritiques, l'expression de  $Na_v1.7$  diminue rapidement (Kis-Toth et al., 2011; Zsiros et al., 2009). Les lymphocytes expriment également des canaux  $Na_v$ . L'influx et l'augmentation de la concentration intracellulaire de sodium participent à la prolifération et à la maturation cellulaire, en régulant le volume cellulaire et en inhibant l'apoptose (Roselli et al., 2006). Par ailleurs, l'inhibition des canaux  $Na_v$  diminue l'invasivité des cellules Jurkat dans un modèle de lymphocytes T humains (Fraser et al., 2004).

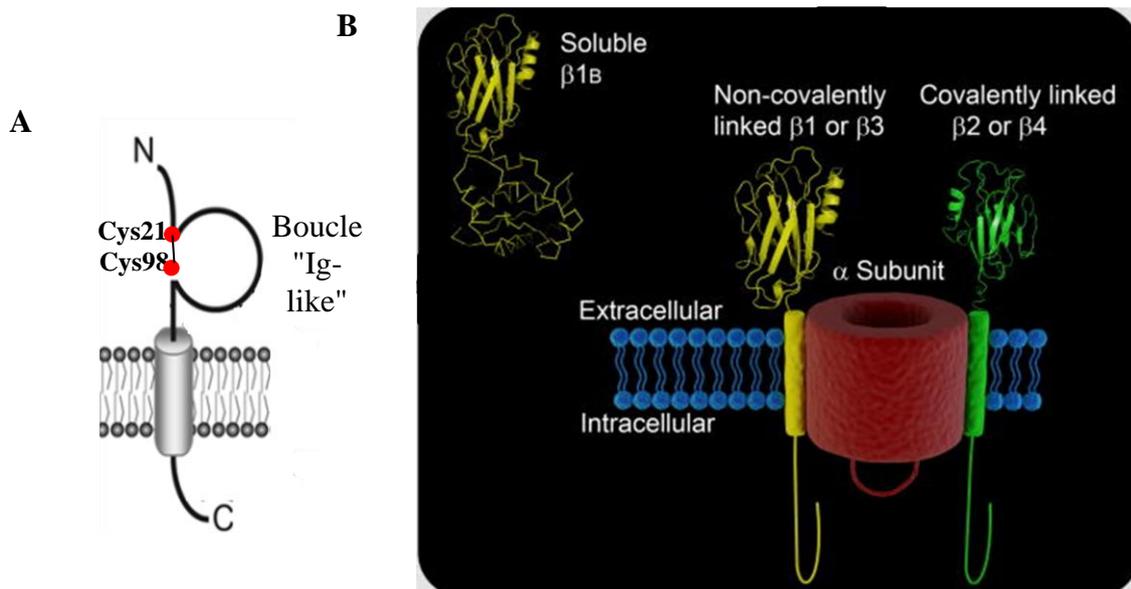
Un autre rôle des  $Na_v$  est décrit dans des cellules endothéliales. Des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) expriment des canaux sodiques dépendants du voltage,  $Na_v1.4$  et  $Na_v1.8$ , dont l'activité inhibe l'activation d'ERK1/2 induite par les contraintes de cisaillement sans effet sur la phosphorylation d'ERK1/2 (Traub et al., 1999). Une étude plus récente en 2011 montre que les isoformes  $Na_v1.5$  et  $Na_v1.7$  sont également exprimées dans les cellules HUVEC et que leur activité augmente la prolifération via l'activation d'ERK1/2 induite par le VEGF, augmente la tubulogénèse et la migration cellulaire (Andrikopoulos et al., 2011).

La contribution des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules non-excitables est encore mal caractérisée et pourrait varier en fonction des types cellulaires. Ainsi, les canaux  $Na_v$  sont également exprimés dans des fibroblastes (Bakhrarov et al., 1995), des ostéoclastes (Gaspar et al., 1995), des ostéoblastes (Black et al., 1995), des odontoblastes (Allard et al., 2006), des kératinocytes (Zhao et al., 2008) et des chondrocytes (Sugimoto et al., 1996) où leurs rôles restent à déterminer.

## B. Les sous-unités auxiliaires $\beta$ des canaux sodiques dépendants du voltage.

### 1. Gènes et structure

Les canaux sodiques sont des structures multimériques composées d'une sous-unité principale  $\alpha$  et d'une à plusieurs sous-unités régulatrices  $\beta$  (Catterall, 1992) (figure 9). A ce jour, cinq sous-unités  $\beta$  codées par quatre gènes ont été identifiées chez les mammifères :  $\beta 1$  (36 KDa (Isom et al., 1992) ainsi qu'un variant d'épissage alternatif nommé  $\beta 1B$  (précédemment appelée  $\beta 1A$ , (Kazen-Gillespie et al., 2000) sont codés par le gène *SCN1B* situé sur le chromosome 19. Les isoformes  $\beta 2$  (33 KDa ; (Isom et al., 1995),  $\beta 3$  (Morgan et al., 2000) et  $\beta 4$  (Yu et al., 2003) sont codées respectivement par les gènes *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B* situés également sur le chromosome 19 chez l'Homme. A l'exception de  $\beta 1B$ , les sous-unités  $\beta$  ont une structure assez simple composée d'un seul segment transmembranaire, un court domaine C-terminal intracellulaire et d'un grand domaine N-terminal extracellulaire similaire à un domaine d'immunoglobuline : "Ig-like" (figure 9) (Isom et al., 1995; Yu et al., 2003).

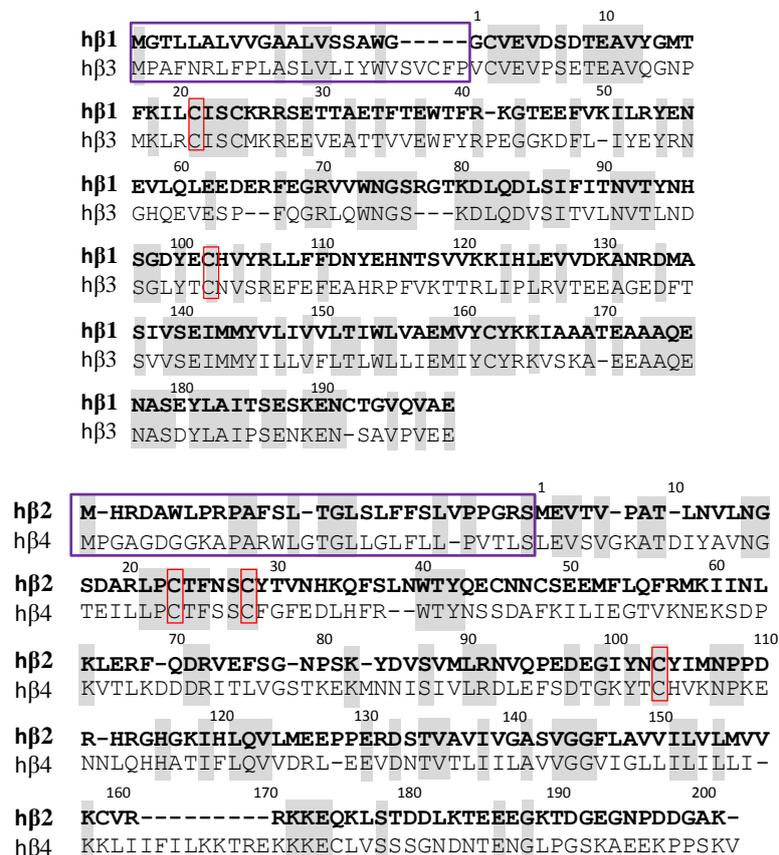


**Figure 9 :** Représentation schématique d'une sous-unité auxiliaire  $\beta$  seule ou en complexe protéique  $Na_v$ -  $\beta$ .

A, Les sous-unités  $\beta$  se composent d'un domaine N-terminal extracellulaire contenant une boucle "Ig-like" formée par un pont disulfure entre deux cystéines (points rouges), d'un segment transmembranaire (TM) et un petit domaine C-terminal intracellulaire. B, Le complexe protéique formé de la sous-unité principale  $\alpha$  de  $Na_v$  et d'une ou plusieurs sous-unités auxiliaires  $\beta$ .  $\beta 1$  et  $\beta 3$  sont associées à  $Na_v$  par des liaisons non-covalentes alors que  $\beta 2$  et  $\beta 4$  interagissent avec  $Na_v$  par une liaison covalente. La sous-unité  $\beta 1B$  est le produit d'un variant d'épissage du gène *SCN1B*, c'est une protéine soluble dans le milieu extracellulaire. (D'après (Brackenbury et al., 2008).

L'extrémité Ig-like du domaine extracellulaire forme une boucle due à la présence de deux résidus cystéines très conservés parmi toutes les sous-unités  $\beta$  (Cys-21 et Cys-98), et qui contribuent à la formation d'un pont disulfure intramolécule (Chen et al., 2012) (Figure 9). Lors de la transcription

du variant d'épissage  $\beta 1B$ , la rétention de l'intron 3 entraîne la non traduction du segment transmembranaire et intracellulaire et génère ainsi l'expression d'une protéine soluble extracellulaire (Kazen-Gillespie et al., 2000; Qin et al., 2003). Les sous-unités  $\beta$  peuvent être classées en deux groupes basés sur leur homologie de séquences et leurs interactions moléculaires avec la sous-unité principale  $\alpha$  de  $Na_v$ . Ainsi,  $\beta 1$  et  $\beta 3$  présentent environ 60% d'homologie de séquence (Isom et al., 1992; Morgan et al., 2000) (Figure 10). Les sous-unités  $\beta 2$  et  $\beta 4$  ont 35% de leur séquence en commun (Figure 10) et possèdent, dans leur domaine extracellulaire, une cystéine particulière en position 26. Cette cystéine est conservée seulement dans ces deux protéines, et non dans  $\beta 1$  et  $\beta 3$ , et leur permet de se lier de façon covalente, par un pont disulfure, à la sous-unité principale  $\alpha$  de  $Na_v$  (Chen et al., 2012; Yu et al., 2003). La cystéine de la sous-unité  $\alpha Na_v$  responsable de cette interaction pourrait être une des trois cystéines situées sur la boucle extracellulaire entre les segments S5 et S6 du domaine II, uniquement conservées chez les mammifères (Chen et al., 2012).



**Figure 10 :** Homologie entre les séquences protéiques des sous-unités  $\beta$ .

h $\beta 1$  : séquence protéique de  $\beta 1$  chez l'Homme ; h $\beta 2$  : séquence protéique de  $\beta 2$  chez l'Homme ; h $\beta 3$  : séquence protéique de  $\beta 3$  chez l'Homme ; h $\beta 4$  : séquence protéique de  $\beta 4$  chez l'Homme. La séquence encadrée en violet est un peptide signal. Les acides aminés homologues sont en gris. Les cystéines impliquées dans la formation du pont di-sulfure sont encadrées en rouge ainsi que la cystéine (position 28) impliquée dans la liaison entre  $\beta 2$  ou  $\beta 4$  et  $\alpha Na_v$ .

Tout comme les sous-unités  $\alpha$ , les sous-unités  $\beta$  sont très exprimées dans les cellules excitables comme les neurones du système nerveux central et périphérique et les cellules musculaires (cardiaques et squelettiques) (Isom et al., 1992; Isom et al., 1995; Lopez-Santiago et al., 2006; Maier et al., 2004; Morgan et al., 2000; Yu et al., 2003; Zhao et al., 2011). Elles sont également exprimées dans des cellules non-excitables comme les cellules gliales ou les cellules endothéliales (Andrikopoulos et al., 2011; Lo et al., 2012). Les interactions entre sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle dans l'adressage membranaire et la fonctionnalité des canaux  $\text{Na}_v$  mais les effets peuvent être très différents en fonction de la composition en sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe (Patino and Isom, 2010). De plus, leur structure particulière fait de ces sous-unités  $\beta$  des membres de la superfamille des molécules d'adhésion (CAMs, Cell Adhesion Molecules). Elles interagissent avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et du cytosquelette et participent à la régulation de certaines fonctions cellulaires telles que la migration et l'agrégation cellulaire (Brackenbury et al., 2008).

## 2. Rôles des sous-unités $\beta$ sur les sous-unités principales $\alpha$ des canaux $\text{Na}_v$

Depuis le clonage de la première sous-unité  $\beta$  en 1992 par L. Isom (Isom et al., 1992), de nombreuses équipes se sont intéressées à l'effet de ces sous-unités sur l'expression et l'activité des isoformes de la sous-unité principale  $\alpha$   $\text{Na}_v$  (Tableau 1). Cependant l'hétérogénéité des systèmes utilisés (système d'expression, *in vivo* ...) ainsi que la diversité des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  rendent difficile la compréhension des mécanismes.

Pour la sous-unité  $\beta_1$ , sa co-expression avec  $\text{Na}_v1.2$  dans un modèle d'expression (cellules CHO, Chinese Hamster Ovary) augmente le courant  $I_{\text{Na}}$  de pic et décale la courbe d'activation vers des potentiels plus dépolarisés mais n'a pas d'effet sur la disponibilité et les cinétiques d'activation et d'inactivation (Qin et al., 2003). Une interaction de  $\beta_1$  avec la contactine favoriserait le transport de  $\text{Na}_v1.2$  vers la membrane plasmique (Xiao et al., 1999). Lorsque la sous-unité  $\beta_1$  est co-exprimée avec  $\text{Na}_v1.5$  dans le même modèle cellulaire, une augmentation de la densité de courant d'environ 43% est observée avec un déplacement des courbes d'activation et de disponibilité vers des potentiels plus dépolarisés et une augmentation de la durée de réactivation (Xiao et al., 2000). Il a également été montré que l'association de la sous-unité  $\beta_1$  à  $\text{Na}_v1.5$  intervient dans le réticulum endoplasmique et augmente l'efficacité du transport de  $\text{Na}_v$  vers la membrane plasmique (Fahmi et al., 2001; Zimmer et al., 2002). Deux mutations de  $\beta_1$  (R85 et D153) ont été décrites chez des patients ayant des fibrillations auriculaires. La co-expression de ces mutants avec  $\text{Na}_v1.5$  diminue l'amplitude du courant

$I_{Na}$  et induit un décalage des courbes d'activation et de disponibilité vers des potentiels plus hyperpolarisés par rapport à la protéine sauvage. L'interaction de  $\beta 1$  avec ces deux isoformes ( $Na_v1.2$  et  $Na_v1.5$ ) produit des effets similaires, c'est-à-dire une augmentation du courant de pic. Le domaine d'interaction entre  $\beta 1$  et  $Na_v$  est différent en fonction de l'isoforme  $\alpha$  associée : son domaine extracellulaire interagirait avec  $Na_v1.2$  via les domaines D1/S5-S6 et DIV/S5-S6 (Makita et al., 1996; McCormick et al., 1998; Meadows et al., 2001). Cette interaction régule directement les propriétés électrophysiologiques des canaux  $Na_v1.5$  alors que la partie transmembranaire et intracellulaire de  $\beta 1$  modulerait plutôt son expression membranaire.

La sous-unité  $\beta 2$  semble se lier à  $\alpha Na_v$  par une liaison covalente via la cystéine 26 de  $\beta 2$  (Chen et al., 2012). Il a été décrit chez des souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène *SCN2B*, une diminution de la quantité de canaux  $Na_v$  à la membrane et un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Chen et al., 2002). L'effet de la co-expression de  $\beta 2$  sur la modulation de  $Na_v$  est dépendant de l'isoforme considérée. Une co-expression de  $\beta 2$  avec  $Na_v1.2$  provoque une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation, un décalage de la courbe de disponibilité vers des potentiels plus négatif (-2 mV) et une augmentation du courant de pic (Isom et al., 1995). A l'inverse, la co-expression de  $\beta 2$  avec  $Na_v1.8$  entraîne un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (+4 mV) sans effet sur l'activation, les cinétiques d'activation ou d'inactivation ou sur la densité de courant (Vijayaragavan et al., 2004; Zhao et al., 2011). La co-expression de  $\beta 2$  avec  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.6$  ou  $Na_v1.7$  n'induit pas d'effet sur la dépendance au voltage, ni sur les cinétiques d'activation ou d'inactivation, ni même sur la densité de courant (Cummins et al., 2001; Zhao et al., 2011). Il a été retrouvé une mutation de  $\beta 2$  sur l'arginine 28 située dans le domaine extracellulaire chez des patients atteints de fibrillations auriculaires. Dans un modèle d'expression, cette mutation entraîne une diminution d'amplitude du courant sodique et un décalage vers des potentiels plus dépolarisés de la courbe d'activation.

L'homologie de séquence entre  $\beta 1$  et  $\beta 3$  a conduit de nombreuses équipes à comparer les effets observés avec la sous-unité  $\beta 1$  à ceux observés avec la sous-unité  $\beta 3$ . Tout comme  $\beta 1$ , la sous-unité  $\beta 3$  est décrite comme étant un régulateur clé dans le transport de la sous-unité  $\alpha Na_v$  du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique (Fahmi et al., 2001). Une colocalisation de  $\beta 3$  avec la calnexine indique une localisation préférentielle de cette sous-unité dans le réticulum endoplasmique (Adachi et al., 2004). En effet, l'équipe de Zhang et collaborateurs a décrit une séquence, dans la première boucle intracellulaire de  $Na_v1.8$ , qui interagit avec le domaine C-terminal de  $\beta 3$ . Cette interaction masque le motif de rétention (RRR) de  $Na_v1.8$  dans le réticulum endoplasmique et favorise alors son adressage à la membrane plasmique (Zhang et al., 2008). Il a

également été décrit une interaction entre le domaine C-terminal de  $\beta 3$  et le domaine C-terminal de  $\text{Na}_v 1.1$  (Spampanato et al., 2004). La localisation de la sous-unité  $\beta 3$  est corrélée à celle de  $\text{Na}_v 1.8$  et  $\text{Na}_v 1.9$  dans les fibres nociceptives (Akopian et al., 1996; Sangameswaran et al., 1996). Une lésion neuronale induit une augmentation des ARNm et des protéines de  $\beta 3$  dans les fibres des nocicepteurs de type C et est responsable d'une augmentation de l'expression de  $\text{Na}_v 1.3$  (Casula et al., 2004; Sangameswaran et al., 1996; Shah et al., 2000). La sous-unité  $\beta 3$  intervient donc dans la modulation de l'activité de  $\text{Na}_v$  au niveau neuronal mais également au niveau cardiaque. Chez des souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène *SCN3B* (KO pour le gène *SCN3B*), la durée de la période réfractaire est réduite et la durée des potentiels d'action est plus courte. Ces résultats sont corrélés avec une diminution du courant sodique et un décalage de la courbe de disponibilité des canaux  $\text{Na}_v$  vers des potentiels plus hyperpolarisés (Hakim et al., 2008). Sur ce même type de souris KO, il a été décrit une conduction auriculaire anormale pouvant entraîner des arythmies (Hakim et al., 2010). Certaines mutations de la protéine  $\beta 3$  sont associées à des pathologies comme par exemple la substitution d'une valine en position 110 de  $\beta 3$  retrouvée chez des patients japonais atteints d'un syndrome de Brugada. Cette mutation est responsable d'une diminution de l'expression membranaire de  $\text{Na}_v 1.5$  et d'une diminution de la densité de courant sodique (Ishikawa et al., 2013).

La sous-unité  $\beta 4$  est la dernière des sous-unités  $\beta$  à avoir été décrite (Yu et al., 2003). Elle est aujourd'hui considérée comme une protéine régulatrice intracellulaire de  $\alpha\text{Na}_v$ . Une séquence de six acides aminés (LITFIL) contenue dans la partie intracellulaire de  $\beta 4$ , stabilise son interaction avec le canal et produit un courant sodique dit "résurgent" (Bant and Raman, 2010; Grieco et al., 2005; Lewis and Raman, 2011). Après leur ouverture, les canaux peuvent être bloqués rapidement par des protéines intracellulaires (ici  $\beta 4$ ) qui empêchent alors la liaison de la boucle d'inactivation ("ball and chain") au pore du canal. La repolarisation membranaire expulse ces bloqueurs ce qui induit un flux d'ion  $\text{Na}^+$  nommé "courant résurgent" avant l'inactivation des canaux. Une étude plus récente montre que l'induction de ce courant résurgent par  $\beta 4$  est influencée par le mouvement du segment S4 du domaine IV (DIVS4) (Lewis and Raman, 2013). En effet, lorsque le déploiement de DIVS4 est restreint par la fixation de l'antillatoxine (ATX), la séquence intracellulaire de  $\beta 4$  peut toujours se fixer à  $\text{Na}_v$  mais la liaison est trop instable pour inhiber la fixation de la boucle d'inactivation. Dans les conditions normales (sans ATX), le segment S4 stabilise l'interaction entre  $\beta 4$  et  $\alpha\text{Na}_v$  et permet ainsi l'établissement du courant résurgent. La sous-unité  $\beta 4$ , lorsqu'elle est mutée ou que son expression est perturbée, est impliquée dans certaines pathologies. Son expression est diminuée dans la maladie de Huntington et associée à une diminution de la longueur et des branchements des neurites. Une substitution (L179F) dans son domaine transmembranaire est associée au syndrome de QT long (Medeiros-Domingo et al., 2007; Oyama et al., 2006). C'est également la sous-unité  $\beta$  qui

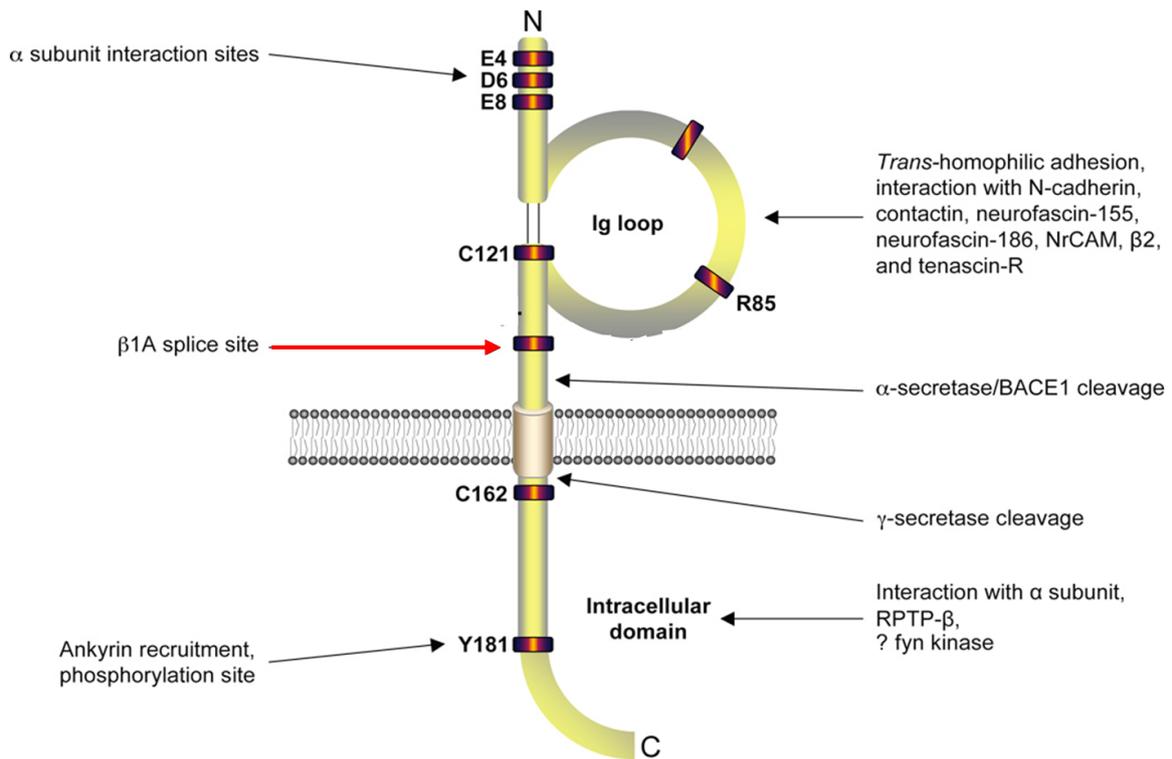
entraîne la plus grande variation de sensibilité du canal  $\text{Na}_v1.2$  à différentes toxines. La co-expression de la sous-unité  $\beta_4$  avec  $\text{Na}_v1.2$  lève l'inhibition du courant par la Pro-Toxine-II contrairement aux autres sous-unités qui ont peu ou pas d'effet. Les mutations des cystéines 58 et 131 restaurent respectivement, partiellement ou totalement cette inhibition (Gilchrist et al., 2013). La cystéine 58, conservée dans les deux sous-unités  $\beta_2$  et  $\beta_4$  pourrait être un site de liaison avec la sous-unité  $\alpha\text{Na}_v$ . La cystéine 131 aurait un rôle potentiel dans le maintien de la structure tertiaire de la protéine, dans une conformation spécifique permettant l'interaction avec  $\alpha\text{Na}_v$ . Les protéines  $\beta_1$  et  $\beta_4$  ont des rôles antagonistes :  $\beta_1$  favorise l'inactivation alors que  $\beta_4$  favorise l'activation des courants sodiques (Aman et al., 2009). Un équilibre doit donc être maintenu entre l'expression de ces différentes sous-unités. Par exemple, la perte d'expression ou des mutations de la sous-unité  $\beta_1$  entraînent des troubles de l'excitabilité, chez l'homme comme chez la souris, qui pourraient être dus à l'action de la sous-unité  $\beta_4$  (Aman et al., 2009).

### 3. Autres rôles des sous-unités $\beta$

En plus de leur rôle de régulation des canaux  $\text{Na}_v$ , les sous-unités  $\beta$  sont des membres de la grande famille des molécules d'adhésion cellulaire (CAM) et régulent à ce titre les phénomènes d'adhésion cellulaire, de migration, etc. (Isom et al., 1995; Yu et al., 2003) (Tableau 1). Trois des quatre sous-unités  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ ) ont été décrites pour participer à l'adhésion cellulaire *trans*-homophile, c'est-à-dire établir une liaison entre deux sous-unités identiques portées chacune par des cellules voisines (Malhotra et al., 2000; Nelson et al., 2014; Yereddi et al., 2013). Cette liaison nécessite le recrutement d'ankyrine au point de contact cellule-cellule et provoque alors l'agrégation cellulaire (Malhotra et al., 2000; McEwen and Isom, 2004). Il a été montré dans un système d'expression que la phosphorylation de la tyrosine 181 du domaine intracellulaire de la protéine  $\beta_1$  inhibe le recrutement des ankyrines G (Malhotra et al., 2002). Ceci modifierait donc indirectement l'adressage membranaire des canaux  $\text{Na}_v$ . En effet, nous avons vu précédemment que le transport de  $\text{Na}_v$  vers la membrane plasmique était dépendant de son interaction avec l'ankyrine G. Les sous-unités  $\beta$ , via le recrutement d'ankyrine, joueraient alors le rôle d'intermédiaires entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (liaison ankyrine-spectrine) (Bennett, 1992). Dans des cardiomyocytes, la phosphorylation de cette tyrosine 181 est déterminante pour la localisation de  $\beta_1$  au niveau des disques intercalaires et son association avec  $\text{Na}_v1.5$ , la N-cadhérine et la connexine-43. Lorsque  $\beta_1$  n'est pas phosphorylée elle est plutôt localisée dans les tubules-T et combinée à des canaux  $\text{Na}_v$  TTX-S comme  $\text{Na}_v1.1$  et  $\text{Na}_v1.6$ , et à l'ankyrine B (Malhotra et al., 2004).

Les sous-unités  $\beta$  interagissent également avec d'autres CAM et protéines de la matrice extracellulaire (on parle alors d'adhésion hétérophile). Elles peuvent se lier avec des protéines telles que la contactine, la neurofascine-155 (Nf-155), la neurofascine-186 (Nf-186), NrCAM (neuronal cell adhesion molecule), les tenascines C et R ou encore la N-cadhérine mais également avec d'autres sous-unités  $\beta$  (Kazarinova-Noyes et al., 2001; Malhotra et al., 2004; Ratcliffe et al., 2001; Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999) (figure 11). L'effet de  $\beta 1$  sur l'expression et la fonctionnalité des  $\text{Na}_v$  est dépendant de son interaction avec les autres protéines comme la Nf-186 mais également les ankyrines et la contactine (McEwen et al., 2004). L'interaction de  $\beta 1$  avec la Nf-186, au niveau du domaine extracellulaire de  $\beta 1$ , augmente l'expression de  $\text{Na}_v 1.2$  à la membrane plasmique dans un système d'expression (Ratcliffe et al., 2001). Les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  peuvent aussi se lier à la tenascine et influencer la localisation membranaire de  $\text{Na}_v 1.2$  au niveau des nœuds de Ranvier. En effet, un motif (non déterminé) du domaine extracellulaire de  $\beta 1$  et  $\beta 2$  se lie à la tenascine-R (retrouvée principalement dans le système nerveux) via les domaines FN1-2 et FN6-8 de la tenascine-R (figure 11). Cette liaison modulerait la migration de fibroblastes par un effet répulsif entre la sous-unité  $\beta$  et la tenascine (Xiao et al., 1999). Un site potentiel de liaison à la tenascine-C (retrouvée au cours du développement dans les tendons, os et les cartilages ainsi que dans les cellules de la crête neurale qui ont la capacité de migrer) au niveau des domaines FN-A, FN-B et FN6-8, a été décrit seulement dans  $\beta 2$  et pourrait favoriserait l'interaction avec  $\alpha\text{Na}_v$  (Srinivasan et al., 1998).

Certaines sous-unités  $\beta$  interviennent dans la formation de prolongements membranaires dans les neurones (cellules de neuroblastome, neurones granulaires du cervelet). Les protéines  $\beta 1$  et  $\beta 4$  sont responsables d'une augmentation de la longueur des neurites (Brackenbury et al., 2008; Oyama et al., 2006). Cet effet de  $\beta 1$  requiert l'activation de la voie des Kinases Src (figure 11), la présence de la contactine et de canaux  $\text{Na}_v$  fonctionnels au sein des radeaux lipidiques (Brackenbury et al., 2008). Par ailleurs, dans des conditions associées à l'astrogliose (activation des astrocytes suite à une lésion), une surexpression de  $\beta 1$  est observée. Celle-ci semble être sous la dépendance de signaux extracellulaires tels que les facteurs de croissance du type EGF ou FGF. Cette augmentation de l'expression de  $\beta 1$  est associée à des changements morphologiques des cellules astrogliales qui modifieraient leur communication avec les neurones lors d'une lésion ou d'une pathologie (Aronica et al., 2003). La protéine  $\beta 2$  favorise le développement d'extensions membranaires de type filopodes et le développement de branchements dendritiques lors du développement des neurones hippocampiques de rat (Maschietto et al., 2013).



**Figure 11** : Représentation schématique de l'architecture fonctionnelle de la sous-unité β1.

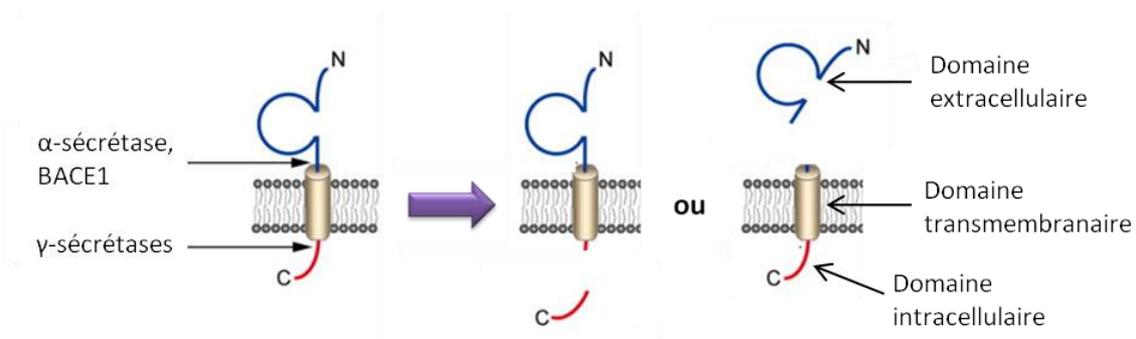
Le variant d'épissage β1A est une protéine soluble extracellulaire dont le domaine C-terminal est représenté au niveau de la flèche rouge. La protéine β1 contient des sites d'interactions avec la sous-unité α des canaux NaV mais également avec d'autres protéines extracellulaires au niveau de la boucle "Ig-like" (Ig loop) ou avec des protéines intracellulaires. Elle contient également des sites de clivages par les α-sécrétases ou BACE1 sur son domaine extracellulaire ainsi qu'un site de clivage par les γ-sécrétases sur son domaine intracellulaire. Les acides aminés symbolisés par des rectangles orange représentent des sites d'interaction avec d'autres protéines et/ou de mutations potentielles dans certaines pathologies (D'après (Brackenbury et al., 2008).

**Tableau 1 :** Description des différents rôles des sous-unités  $\beta$  sur, ou indépendamment, des sous-unités principales  $\alpha$

	Rôle sur $\alpha$					Autre rôle		
	Transcription	adressage à la membrane	courant	Activation	Disponibilité	Adhésion cellule-cellule	Adhésion cellule-matrice	Morphologie cellulaire
<b><math>\beta 1</math></b>	Nd	<p>↑ Na<sub>v</sub>1.5 (Zimmer et al. 2002)</p> <p>↑ Na<sub>v</sub>1.2 (Xiao et al. 1999)</p>	<p>↑ pic (Qin et al. 2003)</p>	décalage vers potentiels positifs (Xiao et al. 2000)	décalage vers potentiels positifs (Xiao et al. 2000)	<p><i>trans</i>-homophile (Malhotra et al. 2000)</p>	<p>tenascine-R (Xiao et al. 1999)</p> <p>Contactine (McEwen et al. 2004)</p> <p>N-cadherine (Malhotra et al. 2004)</p> <p>NF-155 (McEwen et al. 2004)</p> <p>NF-186 (McEwen et al. 2004)</p> <p>NrCAM (McEwen et al. 2004)</p>	<p>↑ longueurs neurites (Brackenbury et al. 2008)</p>
<b><math>\beta 2</math></b>	<p>↑ Na<sub>v</sub>1.1 (Kim et al. 2014)</p>	<p>↑ Na<sub>v</sub> (Chen et al. 2002)</p>	<p>↑ pic (Isom et al. 1995)</p>	pas d'effet	<p>décalage -2 mV (Na<sub>v</sub>1.2) (Isom et al. 1995)</p> <p>+ 4 mV (Na<sub>v</sub>1.8) (Zhao et al. 2011)</p>	<p><i>trans</i>-homophile (Malhotra et al. 2000)</p> <p>Hétérophilique (<math>\beta 1</math>) (McEwen et al. 2004)</p>	<p>tenascine-C et R (Srinivasan et al. 1998)</p>	<p>↑ filipodes (Maschietto et al. 2013)</p>
<b><math>\beta 3</math></b>	Nd	<p>↑ Na<sub>v</sub>1.3 (Casula et al. 2004)</p> <p>↑ Na<sub>v</sub>1.5 (Ishikawa et al. 2013)</p> <p>↑ Na<sub>v</sub>1.8 (Zhang et al. 2008)</p>	<p>↑ pic</p>	pas d'effet	décalage vers potentiels négatifs (Hakim et al. 2008)	<p><i>trans</i>-homophile (Yereddi et al. 2013)</p>	Nd	Nd
<b><math>\beta 4</math></b>	Nd		<p>↑ persistant</p> <p>↑ resurgent (Grieco et al. 2005 ; Lewis and Raman, 2011)</p> <p>↓ pic Na<sub>v</sub>1.5 (Medeiros-Domingo A et al. 2007)</p>	pas d'effet	décalage vers potentiels négatifs (Bant et al. 2010)	Nd	Nd	<p>↑ longueurs neurites (Oyama et al. 2006)</p> <p>↑ nombre protrusions (Oyama et al. 2006)</p>

Nd : Non déterminé ; ↑ : augmente ; ↓ : diminue

Les quatre sous-unités  $\beta$  constituent par ailleurs un substrat pour les enzymes protéolytiques de la famille des sécrétases. Trois sites de clivage ont été identifiés (figure 12). Les deux premiers sont situés au niveau du domaine extracellulaire des protéines  $\beta$ , juste en amont du segment transmembranaire et sont des sites pour les  $\alpha$ -sécrétases ainsi que pour les  $\beta$ -sécrétases ou BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) (Gersbacher et al., 2010; Kim et al., 2007; Wong et al., 2005). Le troisième site, pour les  $\gamma$ -sécrétases, est localisé sur le domaine intracellulaire (Kim et al., 2005; Wong et al., 2005). Le clivage des sous-unités  $\beta$  par les  $\gamma$ -sécrétases produit une protéine transmembranaire tronquée, le domaine intracellulaire étant relâché dans le cytosol.



**Figure 12 :** Représentation schématique du clivage protéolytique des sous-unités  $\beta$  par les différentes sécrétases.

Les sous-unités  $\beta$  peuvent être clivées au niveau du domaine extracellulaire par les  $\alpha$ -sécrétases ou BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme), une  $\beta$ -sécrétase. Elles peuvent également être clivées par des  $\gamma$ -sécrétases au niveau de leur domaine intracellulaire (D'après (Brackenbury et al., 2008).

Wong H.K. et collaborateurs ont décrit la production d'un fragment plus court de la sous-unité  $\beta_4$ , étroitement corrélée à l'expression et l'activité de BACE1. L'utilisation d'un siRNA dirigé spécifiquement contre l'expression de BACE1, ou d'un modèle de souris modifiées génétiquement pour invalider ce gène (KO pour le gène de BACE1) entraîne une diminution de près de 80 % de la production de ce petit fragment de  $\beta_4$  (Wong et al., 2005). L'activité de BACE1 conduit donc à la production de fragments membranaires courts contenant le segment transmembranaire et le domaine C-terminal. La perte du domaine extracellulaire de la sous-unité  $\beta_4$ , liée à l'activité de BACE1, diminue le nombre de protrusions membranaires dans les neurones mais n'intervient pas dans l'augmentation de la longueur des neurites dans les cellules de neuroblastome (Miyazaki et al., 2007). Par son effet sur les sous-unités  $\beta$ , BACE1 module également l'expression en ARNm et en protéine des sous-unités principales  $\alpha$  des canaux  $\text{Na}_v$ . Dans des cellules de neuroblastome, l'expression de BACE1 augmente la production de fragment intracellulaire de  $\beta_2$  et augmente les

ARNm de *SCN1A* ( $Na_v1.1$ ) mais n'affecte pas les ARNm de *SCN3A* ( $Na_v1.3$ ) et *SCN8A* ( $Na_v1.6$ ).  $\beta 2$  est indispensable à cet effet puisque sans son expression, BACE1 n'augmente pas l'expression en ARNm de  $Na_v1.1$  (Kim et al., 2007). Afin de comprendre plus en détail le rôle de ce fragment intracellulaire de  $\beta 2$  sur l'expression de  $Na_v$ , Kim DY et collaborateurs ont étudié l'influence des  $\gamma$ -sécrétases. L'utilisation d'un inhibiteur des  $\gamma$ -sécrétases (le DAPT, 3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl-S-phenylglycine t-butyl ester) augmente la proportion de fragments courts de  $\beta 2$  (fragments transmembranaire plus intracellulaire suite au clivage par les  $\alpha$ -sécrétases ou BACE1) suggérant un rôle des  $\gamma$ -sécrétases. Il a en effet été montré que le fragment C-terminal soluble (fragment intracellulaire uniquement) produit suite au clivage par une  $\gamma$ -sécrétase, est dirigé vers le noyau. Une mutation dans l'un des domaines de la préséniline 1, sous-unité catalytique du complexe protéique des  $\gamma$ -sécrétases (Chen et al., 2006), diminue l'expression de canaux sodiques en inhibant partiellement le clivage de  $\beta 2$  dans des cellules neuronales (Kim et al., 2014). Une étude récente utilisant des souris KO pour le gène de BACE1 montre une inactivation plus rapide du courant réurgent (présence de  $\beta 2$ ) sans effet sur l'amplitude ou l'activation du courant (pas d'augmentation de la densité des canaux  $Na_v1.1$ ) et une diminution de la fréquence des potentiels d'action d'environ 20 % dans les cellules de Purkinje de ces souris KO (Huth et al., 2011). Le clivage de  $\beta 2$ , par les deux enzymes  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases, semble être nécessaire à la libération et au rôle du fragment intracellulaire de  $\beta 2$  sur l'expression de  $Na_v$ . Dans un autre modèle de neurones n'exprimant plus *SCN2B*, le niveau en ARNm de plusieurs isoformes de sous-unité  $\alpha$  de  $Na_v$  (*SCN3A*, *SCN8A*, *SCN9A*) et de sous-unités  $\beta$  (*SCN3B*, *SCN4B*) est diminué ainsi que le niveau d'expression des protéines  $Na_v1.1$  et  $Na_v1.7$  (Lopez-Santiago et al., 2006). Ceci suggère que le segment intracellulaire de la sous-unité  $\beta 2$  pourrait être un régulateur transcriptionnel, direct (comme facteur de transcription) ou indirect (activateur de facteur de transcription), de l'expression des canaux  $Na_v$ .

L'activité des enzymes de type  $\alpha$ -sécrétases, en particulier l'enzyme ADAM10, n'a été décrite que sur la sous-unité  $\beta 2$ . Le site de clivage par ADAM10 serait situé sur le domaine extracellulaire, adjacent au segment transmembranaire (Kim et al., 2005). La surexpression du fragment C-terminal de  $\beta 2$  (séquence correspondant au produit de clivage de  $\beta 2$  par ADAM10, TM/C-ter) dans des cellules CHO inhibe l'agrégation et la migration cellulaire (Kim et al., 2007). De plus, la surexpression d'ADAM10, tout comme BACE1 précédemment, augmente la quantité d'ARNm et de protéine de  $Na_v1.1$  (Kim et al. 2007).

#### 4. Pathologies associées aux sous-unités $\beta$ dans les cellules excitables

Il est maintenant établi qu'une mutation ou un dysfonctionnement dans l'expression des sous-unités  $\beta$  des canaux sodiques dépendants du voltage peut être à l'origine de différentes pathologies comme la maladie de Huntington (Oyama et al., 2006), les épilepsies (Scheffer et al., 2007; Wallace et al., 2002) ou encore des anomalies cardiaques (syndromes de QT long, Lopez-Santiago LF et al. 2007, syndrome de Brugada, (Watanabe et al., 2008) ou fibrillation auriculaire, (Watanabe et al., 2009)). Ces anomalies sont le plus souvent associées à des modifications d'adressage ou d'activité des canaux  $\text{Na}_v$  se répercutant sur l'activité électrique des cellules excitables ou bien à des défauts d'adhésion cellulaire.

Certaines maladies neurologiques sont associées à des mutations des sous-unités  $\beta$  (Brackenbury and Isom, 2011; Patino and Isom, 2010). Des mutations dans le gène *SCN1B* sont associées aux épilepsies avec des épisodes fiévreux de type GEFS (generalized epilepsy with febrile seizures) (Audenaert et al., 2003; Meadows et al., 2002; Reid et al., 2014; Wallace et al., 1998; Xu et al., 2007) ou au syndrome de Dravet (épilepsie sévère du nourrisson) (Patino et al., 2009; Reid et al., 2014). Ces mutations du gène *SCN1B* ont été étudiées dans des modèles d'expression et elles sont, pour la majorité, décrites comme des mutations dites "perte de fonction" de la protéine  $\beta 1$ . Une substitution de la glycine en position 257 par une arginine (G257R) provoque la rétention intracellulaire du variant d'épissage  $\beta 1B$ , normalement soluble dans le milieu extracellulaire. Dans ce cas, la migration neuronale (neurones granulaires du cervelet) est désordonnée avec une diminution de la longueur des neurites (Patino et al., 2011). Les mutations R125C (mutation récessive) et I106F de  $\beta 1$  sont associées au syndrome de Dravet (Ogiwara et al., 2012; Patino et al., 2009). Dans un système d'expression (cellules SN11a) la mutation R125C diminue la densité de courant et entraîne un décalage de la courbe de disponibilité vers des potentiels plus dépolarisés (Patino et al., 2009). Les mutations C121W (Wallace et al., 2002) et R85H (Xu et al., 2007) ainsi qu'une délétion des résidus compris entre I70 et E74 sont associées aux épilepsies GEFS+. Il a récemment été observé, chez des souris homozygotes *SCN1B* (C121W), un changement morphologique (diminution de l'arborisation dendritique) des neurones pyramidaux qui induit une hyperexcitabilité (Reid et al., 2014). Jusqu'à maintenant, aucune mutation sur les autres sous-unités  $\beta$  n'a été associée à l'épilepsie. Seule une étude a montré une diminution d'expression de  $\beta 3$  dans l'hippocampe de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (van Gassen et al., 2009).

Dans un modèle animal de douleur chronique suite à une lésion nerveuse périphérique, il est proposé que l'augmentation d'expression de  $\beta 3$  (suite à cette lésion) contribue à une redistribution de  $\text{Na}_v 1.8$  dans les neurones ganglionnaires de cervelet (Gold et al., 2003; Shah et al., 2000). En effet, l'interaction du domaine C-terminal de  $\beta 3$  avec  $\text{Na}_v 1.8$  masque le motif de rétention dans le

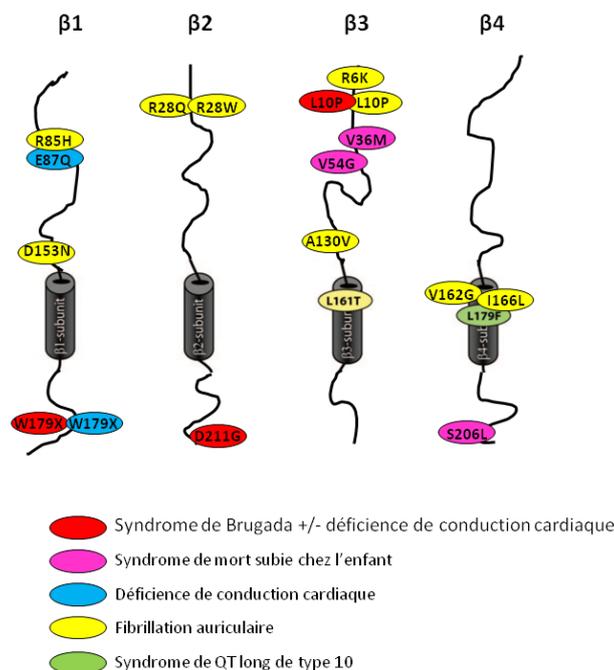
réticulum endoplasmique RRR (trois résidus arginine) du canal, favorisant ainsi l'expression membranaire de Na<sub>v</sub>1.8 et entraînant alors une hyperexcitabilité cellulaire (Zhang et al., 2008). La protéine β2 est néanmoins la sous-unité principalement exprimée dans les neurones du système nerveux périphérique. Des souris KO pour le gène *SCN2B* ont été utilisées dans différents modèles. Ces souris montrent une diminution de la réponse à la douleur inflammatoire par rapport aux souris exprimant la protéine β2 (Lopez-Santiago et al., 2006). L'absence d'expression de β2 dans les neurones ganglionnaires chez les souris KO *SCN2B* n'affecte pas l'activité des isoformes de Na<sub>v</sub> TTX-R (Na<sub>v</sub>1.8 et Na<sub>v</sub>1.9) alors qu'elle diminue la densité de courant sodique des isoformes TTX-S (Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2 et Na<sub>v</sub>1.3) sans effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation, ni sur l'activation et la disponibilité dépendante du voltage (Lopez-Santiago et al., 2006). Dans un modèle de sclérose en plaques, la non-expression de la protéine β2 entraîne une atténuation des symptômes, une diminution de la dégénération axonale et diminue la mortalité (O'Malley et al., 2009). L'expression de β2 dans les neurones du système périphérique semble donc participer à l'expression membranaire des canaux Na<sub>v</sub> et favoriser ainsi l'influx nerveux.

Dans un modèle de maladie de Huntington chez la souris, il a été décrit une diminution de l'expression des ARNm et de la protéine β4 dans le striatum. Ceci a également été confirmé chez des patients atteints de cette maladie (Oyama et al., 2006). Sur le modèle murin, cette diminution apparaît très tôt lors du développement (chez les souris de 4 semaines) et précède les altérations observées sur les autres sous-unités β (diminution d'expression plus faible et plus tardive) (Oyama et al., 2006). Cette diminution de β4 entraîne une neurodégénération précoce associée à une diminution des points de contact entre neurones et à une diminution de la croissance et de la longueur des neurites.

Des mutations des sous-unités β sont également associées à des anomalies cardiaques (figure 13) dues à une régulation de Na<sub>v</sub>1.5. Un séquençage des quatre gènes codant pour les sous-unités β a été réalisé chez différents patients atteints de fibrillations auriculaires. Cette étude révèle plusieurs mutations au niveau du domaine extracellulaire de la protéine β1 : R85H et D153N (Watanabe et al., 2009), de la protéine β2 : R28W et R28Q (Watanabe et al., 2009), et de la protéine β3 : R6K, L10P, L161P (Olesen et al., 2011), A130W (Wang et al., 2010) conduisant dans chaque cas à une diminution de la densité de courant due à l'activité des canaux Na<sub>v</sub>1.5. Aucun effet sur le courant persistant n'est observé, mais il est observé un décalage des courbes d'activation et/ou de disponibilité (en fonction des mutations) vers des potentiels plus dépolarisés (Olesen et al., 2012; Wang et al., 2010; Watanabe et al., 2009). Des mutations dans le domaine extracellulaire de la protéine β4 : V162G et I166L (Li et al., 2013) ont également été retrouvées chez des patients atteints de fibrillations auriculaires mais

leurs effets n'ont pas été étudiés. Une mutation de la sous-unité  $\alpha$  de  $\text{Na}_v1.5$  (R1432G) est associée au syndrome de Brugada (Baroudi et al., 2001). Lors d'une co-expression de ce mutant avec l'isoforme sauvage de  $\text{Na}_v1.5$  dans un système d'expression (cellules HEK293), une diminution de l'expression membranaire de l'isoforme sauvage est observée. Une étude révèle que la sous-unité  $\beta 1$  favorise l'interaction entre deux sous-unités principales  $\alpha$  de  $\text{Na}_v1.5$ , ce qui pourrait expliquer la rétention de l'isoforme sauvage lorsqu'elle est exprimée avec le mutant (Mercier et al., 2012). Les mutations W179X de la sous-unité  $\beta 1$  (Watanabe et al., 2008), H162P du variant d'épissage  $\beta 1B$  (Yuan et al., 2014), D211G de la sous-unité  $\beta 2$  (Riuro et al., 2013) ou L10P de la sous-unité  $\beta 3$  (Hu et al., 2009) D 2009, V110I (Kurakami and Ishii, 2013) diminuent le transport de  $\text{Na}_v1.5$  vers la membrane plasmique et donc diminuent la densité de courant associée au syndrome de Brugada.

Deux mutations dans le domaine extracellulaire de  $\beta 3$  (V54G et V36M) ainsi qu'une mutation dans la partie cytosolique de  $\beta 4$  (S206L) sont impliquées dans le syndrome de mort subite chez l'enfant (Tan et al., 2010) (figure 13) et entraînent une diminution de la densité de courant. Dans cette pathologie ainsi que chez les patients atteints du syndrome de QT long congénital, les mutations S206L, ainsi qu'une seconde mutation L179F au niveau transmembranaire de  $\beta 4$  (Medeiros-Domingo et al., 2007), provoquent également une augmentation du courant persistant et un décalage vers des potentiels plus dépolarisés de l'inactivation.



**Figure 13 :** Représentation schématique des sous-unités  $\beta$  des  $\text{Na}_v$  et leurs mutations associées à des anomalies cardiaques (tiré de Wilde AA et Brugada R, 2011).

Les mutations décrites précédemment semblent, pour la plupart, diminuer ou modifier l'adressage membranaire des différentes isoformes de  $Na_v$  ce qui a une influence directe sur l'excitabilité cellulaire. Cependant, les canaux sodiques dépendants du voltage sont également impliqués dans l'invasivité des cellules cancéreuses dans différents types de cancer. L'intérêt d'étudier le rôle potentiel de ces sous-unités  $\beta$  dans le cancer est donc de plus en plus grand.

## II. Rôles des canaux sodiques dépendants du voltage et de leurs sous-unités auxiliaires $\beta$ dans les cellules cancéreuses

---

### A. Cancérogénèse et développement des métastases

Le processus de cancérogénèse est un phénomène complexe qui comprend de nombreuses phases. Tout d'abord, plusieurs mutations génétiques apparaissent dans une cellule saine pouvant être liées à l'exposition à des carcinogènes chimiques, physiques ou viraux ou à des facteurs héréditaires tels que les mutations de gènes dits "suppresseur de tumeur" (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*). Ces mutations confèrent aux cellules la capacité de se multiplier indépendamment des cellules environnantes. Durant les phases d'hyperplasie et de dysplasie, de nouvelles mutations confèrent aux cellules un avantage de prolifération et de survie et entraînent des changements phénotypiques visibles dans la morphologie des cellules et l'organisation du tissu. Lors de la phase de "cancer *in situ*", les cellules acquièrent des propriétés de malignité : elles prolifèrent indépendamment de leur environnement cellulaire et développent leur propre contrôle autocrine. La tumeur envahit l'organe dans lequel elle est implantée mais reste localisée. Les cellules cancéreuses peuvent alors sécréter des facteurs stimulant l'angiogénèse permettant un apport en éléments nutritifs. Une dernière étape est l'invasivité. A partir de ce moment les cellules acquièrent la capacité d'échapper à la tumeur primaire et d'envahir les tissus adjacents et, en passant dans la circulation (sanguine ou lymphatique), elles envahissent d'autres tissus distants.

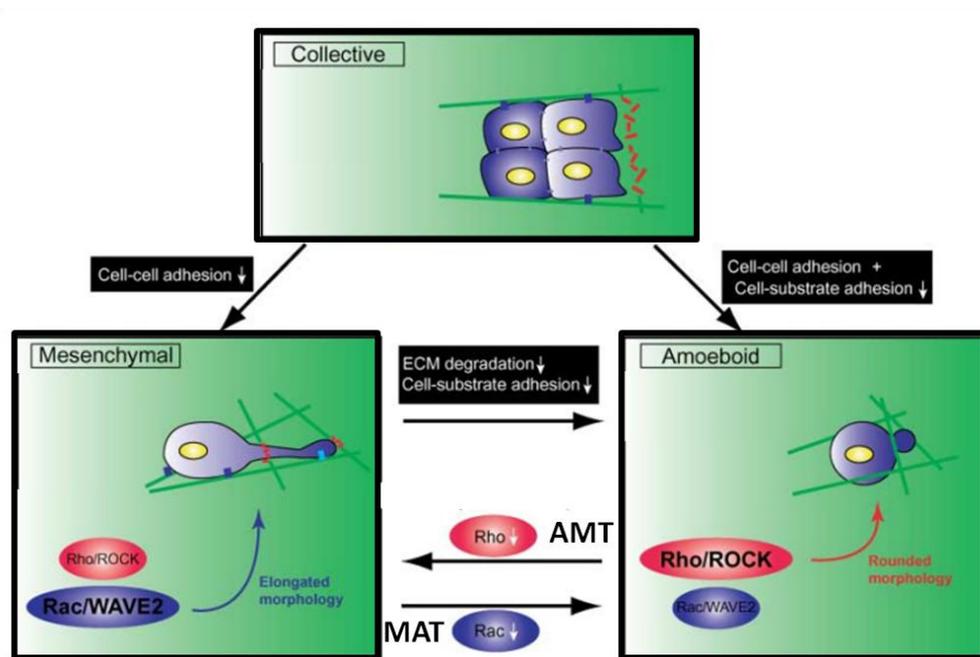
#### 1. Migration et invasivité des cellules cancéreuses

L'implantation et le développement de cellules cancéreuses issues de la tumeur primaire dans d'autres tissus et organes définit le terme métastase. Certains types de cancers présentent une spécificité d'organes en ce qui concerne la dissémination des cellules cancéreuses. Ainsi, de manière assez fréquente, les cancers du sein métastasent préférentiellement au niveau des os, du foie, du cerveau et des poumons. Cette spécificité d'organes est liée à la fois aux capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses et aux facteurs du microenvironnement des sites métastatiques. Le développement métastatique est la cause majeure de décès par cancer. Il représente donc une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies.

La formation des métastases est un phénomène complexe. Pour s'échapper de la tumeur primaire, les cellules développent de nombreux mécanismes leur permettant de franchir différentes barrières. Après avoir dégradé et traversé la lame basale, elles peuvent envahir les organes adjacents (ganglions lymphatiques le plus fréquemment) et/ou rejoindre la circulation (sanguine ou lymphatique) par intravasation dans les vaisseaux lymphatiques ou sanguins. Elles peuvent alors se disséminer dans l'organisme et atteindre tous les organes irrigués par les vaisseaux. L'extravasation (sortie des vaisseaux sanguins) permet ensuite aux cellules qui ont survécu dans la circulation de coloniser de nouveaux tissus et de former des métastases (Friedl and Wolf, 2003).

Dans le cas d'un épithélium, les altérations génétiques et épigénétiques des cellules épithéliales entraînent des modifications transcriptionnelles, morphologiques et fonctionnelles de ces cellules caractérisées par une transition cellulaire nommée Transition Epithelio-Mésenchymateuse (Epithelio-mesenchymal transition, EMT) (Friedl and Alexander, 2011; Huber et al., 2005; Thiery, 2002; Thiery et al., 2009). Lors de cette transition, les cellules perdent leur comportement collectif ainsi que leurs liaisons intercellulaires (E-cadhérine) et adoptent un comportement individuel et invasif caractéristique des cellules mésenchymateuses (Friedl et al., 2004; Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2005). Les cellules sont alors caractérisées par un cytosquelette d'actine organisé en filaments de stress, une adhésion à la matrice qui est dépendante des intégrines et une migration (invasion) protéolytique (Friedl et al., 2004; Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2005). La transition inverse, d'un phénotype mésenchymateux vers un phénotype épithélial, est également possible (MET) et se produit principalement lorsque les cellules ont atteint un site métastatique pour se développer dans le nouveau tissu. Une autre transition des cellules mésenchymateuses nommée Transition Mésenchymo-Amiboïde (mesenchymal-amiboïde transition, MAT) a été caractérisée. Les cellules acquièrent un phénotype dit "amiboïde" : elles sont plus rondes avec un cytosquelette d'actine organisé en réseau cortical sous-membranaire, l'adhésion à la matrice extracellulaire est plus faible que celle des cellules mésenchymateuses et est indépendante des intégrines. Enfin, leur migration (invasion) n'est pas associée à la protéolyse de la matrice extracellulaire, mais est caractérisée par des cycles de formation/déformation de protrusions appelées "blebs" ou bourgeonnements et de contraction actine-myosine (Friedl et al., 2004; Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2005). Les cellules sont donc capables de migrer et d'envahir les tissus mais leur capacité à entrer dans la circulation et se disséminer dans l'organisme n'a pas été démontrée (Pinner and Sahai, 2008; Wolf et al., 2003). Ces cellules sont également capables de repasser d'un phénotype amiboïde à un phénotype mésenchymateux (amiboïde-mesenchymal transition, AMT).

En fonction du type cellulaire et de l'environnement cellulaire, les cellules cancéreuses peuvent migrer de deux façons : individuellement lorsqu'il n'y a pas de jonction cellule-cellule ou bien collectivement lorsque l'adhésion cellule-cellule est possible (Friedl and Wolf, 2010). La migration multicellulaire ou collective est également caractérisée par plusieurs formes de groupes cellulaires en fonction de la morphologie et du type de cellules impliquées et de la structure du tissu envahi. Les cellules ont la capacité de passer d'un type de migration à l'autre (transitions EMT, MAT ou inversement MET et AMT) mais également d'une migration collective en masse à une migration individuelle (figure 14).



**Figure 14 :** Différents types de migration des cellules cancéreuses en fonction des interactions cellule-cellule, cellule-matrice et du phénotype mésenchymateux ou amiboïde.

Les cellules cancéreuses peuvent subir différents types de transitions : elles peuvent passer d'une migration collective à une migration individuelle, elles peuvent développer un phénotype mésenchymateux ou amiboïde selon l'adhésion cellule-cellules ou cellule-matrice. Une transition mésenchymo-amiboïde (MAT) ou inversement (AMT) est possible suivant l'expression ou l'activité des facteurs Rho et Rac. D'après (Yamazaki et al., 2005).

La migration mésenchymateuse fait intervenir un processus cyclique pouvant être décrit en de nombreuses étapes successives : la première est la formation de protrusions membranaires ou pseudopodes au front de migration des cellules. Il y a alors recrutement et agrégation des intégrines à l'extrémité des pseudopodes et aux points focaux d'adhésion. Ces intégrines sont liées au cytosquelette d'actine et stabilisées par la protéine Rac (Cukierman et al., 2001; Friedl and Wolf, 2003; Yamazaki et al., 2005). La Rho-GTPase induit une contraction du cytosquelette d'acto-myosine, ce qui permet une rétractation de la partie postérieure de la cellule accompagnée de la séparation

des filaments d'actine et des intégrines, qui seront recyclées au front de migration (Friedl and Alexander, 2011; Zeng et al., 2003). Ce recyclage des molécules d'adhésion est un facteur limitant pour la vitesse de migration. La vitesse moyenne de migration mésenchymateuse est de 0,1 à 1  $\mu\text{m} / \text{min}$  (Friedl and Wolf, 2003).

La migration amiboïde, faisant référence aux déplacements de l'amibe *Amoeba proteus* et dépend de la formation et déformation des bourgeonnements membranaires. Ces bourgeonnements se forment soit après désassemblage du cortex d'actine soit suite à une rupture d'adhésion entre la membrane plasmique et le cortex d'actine (Charras and Paluch, 2008). La pression hydrostatique extracellulaire sur la cellule provoque l'expansion de la membrane par un flux de cytoplasme. Le mécanisme à l'origine de la dynamique du cytosquelette est contrôlé par la GTPase RhoA (et son effecteur ROCK, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase). L'activation de ROCK phosphoryle la chaîne légère de myosine (Amano et al., 1996) ou inhibe la MLC phosphatase (phosphatase des chaînes légères de myosine) ce qui induit la contraction de la myosine à l'intérieur du bourgeonnement et entraîne sa rétractation. La migration amiboïde ne nécessite pas de recyclage de protéines et peut donc s'effectuer à une vitesse plus rapide de 0,1 à 20  $\mu\text{m} / \text{min}$  (Friedl and Wolf, 2003; Yamazaki et al., 2005).

## 2. Protéases et remodelage du microenvironnement tumoral

Les mécanismes de l'invasion mésenchymateuse comprennent une protéolyse de la matrice extracellulaire. Les protéases ayant une activité extracellulaire sont les principaux acteurs de cette activité protéolytique. Elles peuvent être sécrétées ou associées à la membrane de différentes cellules tumorales telles que les cellules cancéreuses ou les cellules non cancéreuses du stroma tumoral (fibroblastes, macrophages, etc.). La dégradation et le remodelage par protéolyse des composants de la matrice extracellulaire sont indispensables pour la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses (Marko Fonovic and Boris Turk 2014). Les protéases peuvent également s'auto-activer et peuvent conduire à la libération de différents facteurs de croissance et de cytokines séquestrés dans la matrice extracellulaire, et de ce fait influencer la croissance, la morphogénèse ainsi que l'angiogénèse tumorale (Marko Fonovic and Boris Turk 2014). Ces enzymes peuvent être classées en deux catégories : 1/ les protéases associées à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire (protéases de type MT-MMP, ou les ADAM pour A Disintegrin and metalloproteinase) et 2/ les protéases sécrétées dans le milieu extracellulaire (les protéases à sérine, les cathepsines à cystéine et à aspartate ou encore l'activateur du plasminogène de type urokinase).

Cette deuxième catégorie de protéases sécrétées peuvent être totalement libres dans le milieu extracellulaire ou peuvent être liées à la membrane plasmique par des interactions avec des partenaires tels que les intégrines (Hood and Cheresch, 2002), l'annexine II (Bharadwaj et al. 2013) ou des glycoprotéines comme CD44 (Marrero-Diaz et al. 2009). Ces interactions augmentent la stabilité des enzymes et leur activité dans l'environnement péricellulaire. Les métalloprotéinases et les protéases à sérine ont une activité à pH neutre ou légèrement alcalin alors que les protéases à cystéines et à aspartate ont une activité optimale à pH acide (Marko Fonovic and Boris Turk 2014). Une forte expression de MMP, particulièrement de MMP-2 et MMP-9, est corrélée à l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires (Fan et al. 2003 ; Jinga et al. 2006 ; Sun et al. 2009). Les cathepsines B sont les cathepsines à cystéine le plus souvent associées à la progression tumorale (Mohamed and Sloam 2006, Jedezko et al. 2004) et sont également impliquées dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Gillet et al. 2009).

La tumeur est également composée de cellules tumorales non cancéreuses telles que des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules immunitaires ou encore des adipocytes. L'abondance des macrophages dans la tumeur est corrélée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (De Visser et al. 2006 ; Pollard et al. 2008). En effet, les macrophages associés à une tumeur expriment et sécrètent des protéases comme les cathepsines à cystéine (Joyce JA et al. 2004 ; Shree T et al. 2011) ou bien des métalloprotéinases matricielles (dont MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9) (Hiratsuka et al. 2002 ; Pollard JW, 2004). Les macrophages peuvent également sécréter des facteurs de croissance (dont IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, PDGF) et des chimiokines (dont CCL17, CCL18, CCL20) qui stimulent la prolifération et l'invasivité des cellules cancéreuses (Balkwill and Mantovani, 2001 ; Bronte et al. 2010 ; Edsparr et al. 2011). La cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) et le facteur de croissance TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) sécrétés dans le microenvironnement tumoral peuvent induire l'expression et la sécrétion des protéases dans les cellules cancéreuses et stromales (Sevenich and Joyce et al. 2014).

### **3. Métabolisme des cellules cancéreuses**

Les cellules cancéreuses développant un métabolisme glycolytique ont un avantage sélectif dans leur processus prolifératif (Vander Heiden et al., 2009). En effet, les cellules doivent produire assez d'énergie pour survivre dans un environnement hypoxique limité en nutriments où la phosphorylation oxydative est fortement réduite. La persistance du métabolisme glycolytique même

en présence d'oxygène appelée "glycolyse aérobie" ou "effet Warburg" est une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

Le glucose entre dans la cellule par des transporteurs spécifiques de type Glut-1. La glycolyse anaérobie mène à la production de pyruvate. Au cours de ce processus sont générées des molécules d'ATP (2 par molécule de glucose) et de NADH, H<sup>+</sup>. La voie de la glycolyse nécessite du NAD<sup>+</sup>. Ce NAD<sup>+</sup> nécessaire est généré lors de la réduction du pyruvate en lactate par une enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH) suivant la réaction : pyruvate + NADH + H<sup>+</sup> ↔ lactate + NAD<sup>+</sup>. Le pyruvate produit par la glycolyse est normalement transféré dans la matrice mitochondriale où il entre dans le cycle de Krebs. Dans les cellules cancéreuses, l'utilisation mitochondriale est moindre et le pyruvate cytoplasmique sera principalement converti en lactate. Cette production plus importante de lactate permet une plus grande synthèse de NAD<sup>+</sup> et donc accélère la voie glycolytique et la production d'ATP. De plus, en présence d'oxygène, il existe normalement dans les cellules différenciées un mécanisme de rétrocontrôle négatif appelé effet Pasteur : la production d'ATP lors de la réduction du pyruvate inhibe, par rétroaction, l'activité de la phosphofructokinase (PFK, enzyme qui catalyse la transformation de Fructose-6 phosphate en Fructose-1,6 bis phosphate) et donc l'avancée de la glycolyse (Porporato et al., 2011). En condition d'hypoxie, la production d'ATP mitochondriale par les cellules cancéreuses devient insuffisante, l'effet Pasteur n'a plus lieu et la PFK n'est plus inhibée, la voie glycolytique est donc accélérée.

Ce métabolisme est sous la dépendance majeure du facteur HIF (Hypoxia-Inducible Factor). HIF stimule la voie glycolytique en favorisant la transcription de nombreux gènes de tels que : l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la lactate déshydrogénase (LDH) et les transporteurs de glucose de la membrane plasmique (GLUT1 et GLUT4) (Porporato et al., 2011; Semenza et al., 1996). De plus, HIF inhibe la phosphorylation oxydative en stimulant la transcription de PDK4 (Pyruvate Déshydrogénase Kinase 4) qui inhibe le complexe enzymatique PDH (Pyruvate Déshydrogénase). L'activité de la PDH étant diminuée, la conversion du pyruvate en acétyl-CoA est diminuée (Papandreou et al., 2006; Simon, 2006). D'autres voies de signalisation peuvent également accélérer le mécanisme glycolytique telles que c-myc, AMPK (5' AMP-activated protein kinase), p53, ou encore mTOR (mammalian target of rapamycin) (Porporato et al., 2011).

Les protons produits par les cellules lors de la production de lactate sont responsables d'une acidification intracellulaire. Le lactate peut être indirectement impliqué dans la transcription de nombreux gènes ainsi que dans l'angiogenèse (Vegran et al., 2011). Afin d'éviter une acidification intracellulaire trop importante dans les cellules cancéreuses, pouvant conduire à la mort cellulaire,

les protons sont exportés vers le milieu extracellulaire par des transporteurs ioniques. Cette acidification du milieu tumoral est un avantage pour l'invasivité cellulaire par protéolyse via l'activation des protéases extracellulaires optimale à pH acide, les cathépsines à cystéines. En effet, dans différents types de cancer, il a été retrouvé une production plus élevée de lactate dans les tumeurs ayant formé des métastases par rapport aux tumeurs sans dissémination métastatique (Schwickert et al., 1995; Walenta et al., 1997; Walenta et al., 2000).

### *B. Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses*

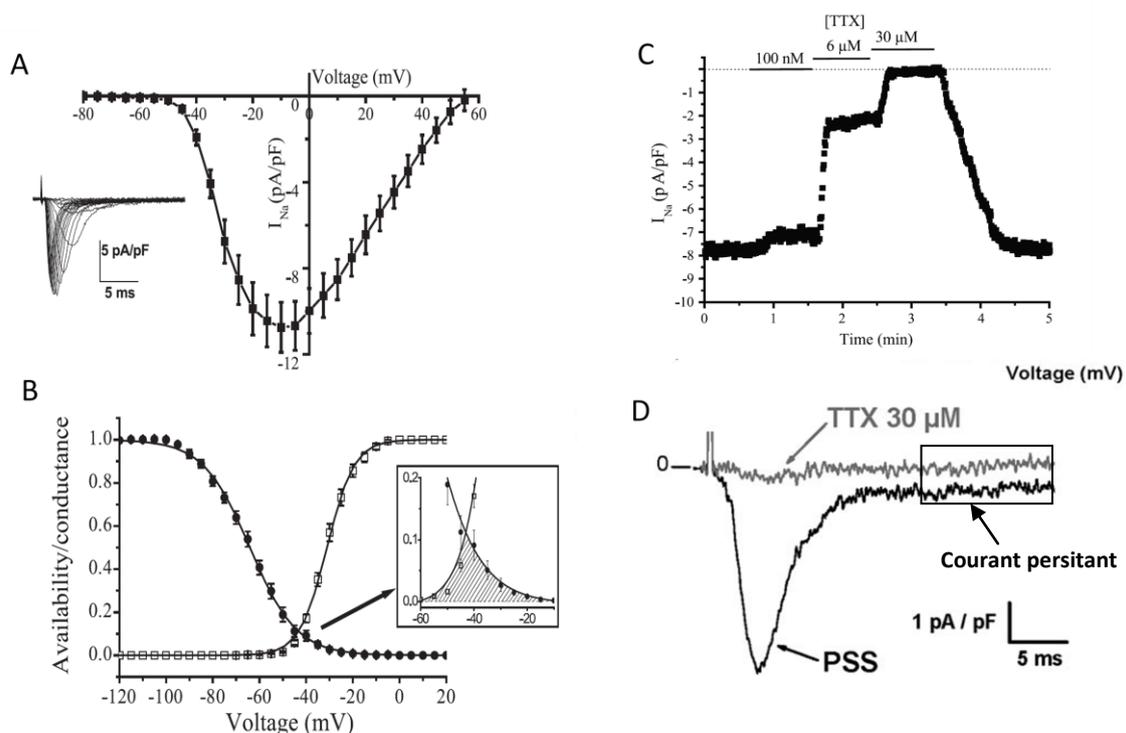
L'expression et le fonctionnement de plusieurs canaux ou transporteurs ioniques sont altérés dans de nombreux cancers tels que les leucémies, les lymphomes, les gliomes, les neuroblastomes ou encore dans les cancers du sein, de la prostate, du poumon ou du colon. Les transporteurs ioniques peuvent être impliqués dans différentes propriétés des cellules cancéreuses telles qu'une hyperprolifération incontrôlée, une résistance à l'apoptose et une capacité accrue de migration et d'invasivité (Arcangeli et al., 2009; Becchetti, 2011; Conti, 2007; Cuddapah and Sontheimer, 2011; Schonherr, 2005 ; Prevarskaya et al., 2010). La motilité et l'invasivité sont des caractéristiques cruciales qui permettent la formation de métastases. Les canaux perméables au calcium, tels que les TRPM8 (Prevarskaya et al. 2007), TRPV6, TRPC6 ou TRPM7 (Prevarskaya et al. 2007 ; Dhennin-Duthille et al. 2014 ; Guilbert et al. 2009) ou les canaux potassiques hERG1, Kir4.1 et Kv3.1 (Lastraioli et al. 2004, Tan et al. 2008, Jang et al. 2009) modulent la prolifération cellulaire. Les canaux TRPM8 participent également à la résistance à l'apoptose (Prevarskaya et al. 2007). Les canaux potassiques de petite conductance activés par le calcium, comme SK3 (également nommé  $K_{Ca2.3}$ ), ou de conductance intermédiaire comme  $IK_{Ca}$  (également nommé  $K_{Ca3.1}$ ), participent à la migration des cellules cancéreuses (Potier et al. 2006 ; Schwab et al. 2006). D'autres transporteurs ioniques sont impliqués plus spécifiquement dans l'invasivité cellulaire : des canaux potassiques tels que hERG (dans les cellules cancéreuses de colon) ou  $BK_{Ca}$  (dans les gliomes), les canaux chlore  $ClC-3$  (Lastraioli et al. 2004 ; McFerrin et al. 2006), ainsi que des canaux sodiques comme les ENaCs (Epithelial Sodium Channels) ou encore les ASICs (Acid-Sensing Ion Channels) (Grimes et al., 1995 ; Roger et al., 2003 ; Vila-Carriles et al. 2006 ; Kapoor et al. 2009). Enfin, des canaux sodiques dépendants du voltage ( $Na_v$ ) comme  $Na_v1.5$  (cancer du sein, Roger et al. 2003, Gillet et al. 2009),  $Na_v1.6$  (cancer des ovaires,

Hernandez-Plata et al. 2012) ou encore  $Na_v1.7$  (cancer du poumon, Campbell et al. 2013) ont également été décrits comme pro-invasifs.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études se sont intéressées à l'expression et au rôle des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cancers. De nombreuses isoformes de  $Na_v$  ont été mises en évidence dans des cellules de cancer de la prostate (Grimes et al., 1995), de cancer du poumon (Campbell et al., 2013; Pancrazio et al., 1989; Roger et al., 2007), de leucémies (Fraser et al., 2004), de cancer du sein (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003), de mésothéliome (Fulgenzi et al., 2006), de neuroblastome (Urbano et al., 1997), de cancer du col de l'utérus (Diaz et al., 2007), de l'ovaire (Gao et al., 2010) et de mélanome (Allen et al., 1997) où elles participent principalement au phénomène d'invasivité cellulaire.  $Na_v1.5$  est l'isoforme la plus exprimée et la seule fonctionnelle dans les cellules cancéreuses mammaires (Fraser et al., 2004; Gillet et al., 2009) tandis que dans les cellules cancéreuses prostatiques expriment majoritairement l'isoforme  $Na_v1.7$  (Diss et al., 2001). Le rôle des canaux  $Na_v$  dans certaines fonctions des cellules cancéreuses est de mieux en mieux caractérisé (Brisson et al., 2011). L'inhibition pharmacologique de l'activité des canaux  $Na_v$  induit la diminution de l'invasion (Campbell et al., 2013; Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003; Smith et al., 1998) mais également de l'adhésion (Palmer et al., 2008), de la galvanotaxie (Djamgoz et al., 2001) et de l'endocytose (Fraser et al., 2005). En revanche, l'activité de ces canaux n'influence pas la prolifération cellulaire (Gao et al., 2010; Hernandez-Plata et al., 2012; Roger et al., 2003). L'effet de l'activité des canaux  $Na_v$  sur la migration cellulaire est discuté : certains groupes trouvent un effet (Fulgenzi et al., 2006; Gao et al., 2010) alors que d'autre non (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2003). Ceci pourrait être expliqué par des différences de conditions de culture cellulaire (milieux utilisés, concentration en sérum, utilisation ou non d'antibiotiques, etc.) ou dans le type d'expérience (migration sur insert, fermeture d'une "plaie" effectuée sur un tapis cellulaire confluent, etc.).

L'expression du gène *SCN5A*, codant pour l'isoforme  $Na_v1.5$ , dans les tissus cancéreux mammaires et non dans les tissus normaux (Yang et al., 2012) semble corrélée au niveau d'invasion des ganglions lymphatiques (Fraser et al., 2005) mais également au développement métastatique et à une diminution de la survie des patientes (Yang et al., 2012). Cette même isoforme est fonctionnelle dans les cellules cancéreuses mammaires humaines hautement invasives de la lignée MDA-MB-231 et non dans les cellules non cancéreuses MCF-10A ou faiblement invasives telle que les MCF-7 ou les MDA-MB-468 (Brisson et al., 2011; Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003). Dans les cellules MDA-MB-231, le courant sodique s'active vers -55 mV, présente un maximum de courant à -5 mV et s'inverse vers +60 mV (qui correspond au potentiel d'équilibre du sodium) (figure 15 A). La superposition des courbes de disponibilité et de conductance met en évidence une zone particulière de potentiels

membranaires appelés zone de fenêtre de voltages (figure 15 B) où une fraction de canaux restent activés. Le potentiel de membrane des cellules ( $-36,8 \pm 1,5$  mV) se trouvant dans cette zone de fenêtre, la fraction des canaux sodiques qui sont activés entraîne une entrée continue de sodium par un courant dit "de fenêtre" (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). L'existence d'un courant de fenêtre au potentiel de membrane des cellules cancéreuses a également été mise en évidence dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules (Roger et al., 2007). Le courant enregistré dans ces cellules cancéreuses mammaires est caractérisé par des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides et par un courant persistant au voltage membranaire, similaire à celui des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Dans les cellules MDA-MB-231, le courant de pic ainsi que ce courant persistant sont tous les deux bloqués par la TTX à une concentration de  $30 \mu\text{M}$  (Figure 15 C, D).



**Figure 15 :** Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

A, courbe courant-voltage ( $I_{\text{Na}}-V$ ). B, Superposition des courbes de disponibilité et d'activation en fonction du voltage des canaux sodiques  $\text{Na}_v1.5$ . L'insert à droite de la figure B représente le courant compris dans la zone de fenêtre de voltage entre  $-60$  mV et  $-10$  mV. C, Sensibilité à la TTX du courant de pic obtenu par une dépolarisation membranaire à  $-5$  mV pendant 30 ms. D, Courant transitoire (pic) et courant persistant (encadré) obtenus par une dépolarisation membranaire à  $-30$  mV pendant 30 ms et après l'inhibition par la TTX à  $30 \mu\text{M}$ . Tiré de (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003).

La sensibilité à la TTX et l'utilisation de siRNA ont permis de montrer que  $\text{Na}_v1.5$  est la seule isoforme responsable du courant sodique dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). Il a été montré qu'il s'agit d'une isoforme néonatale de  $\text{Na}_v1.5$  issue d'un épissage alternatif de l'ARNm (Fraser et al., 2005).

Des tests d'invasivité *in vitro* sur inserts montrent une diminution du potentiel invasif des cellules MDA-MB-231 lorsque l'activité du canal ou l'expression de la protéine sont inhibées. En effet, l'inhibition du canal  $\text{Na}_v1.5$  par la TTX ou par un siRNA réduisent d'environ 30 % l'invasivité des cellules MDA-MB-231 alors qu'elle n'ont pas d'effet sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-468 qui ne possèdent pas de courants sodiques (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). A l'inverse une augmentation du courant de fenêtre par la vératridine (un inhibiteur de l'inactivation du canal), augmente l'invasivité des cellules cancéreuses (Cestele and Catterall, 2000; Wang and Wang, 2003). Cet effet est inversé par la co-application de TTX. De plus, dans un modèle de culture en trois dimensions, dans une matrice composée de Matrigel mimant la matrice extracellulaire, où les cellules MDA-MB-231 forment des colonies, l'application de TTX réduit la taille de celles-ci et également le nombre de cellules qui s'en échappent. Ainsi, bien que  $\text{Na}_v1.5$  ne soit pas impliqué dans la prolifération cellulaire, son activité sur l'invasivité pourrait jouer un rôle dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique *in vivo* (Gillet et al., 2009).

L'influx de sodium par le canal  $\text{Na}_v1.5$  semble important dans l'invasivité des cellules MDA-MB-231 puisqu'un siRNA inhibant spécifiquement l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  n'entraîne pas de diminution supplémentaire de l'invasivité par rapport à l'inhibition pharmacologique par la TTX (Gillet et al., 2009). Il a également été montré que l'activité du canal entraîne une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire par ces cellules cancéreuses dépendante d'une acidification extracellulaire qui est favorable à l'activité de protéases, les cathepsines B et S extracellulaires (Gillet et al., 2009). Cette acidification est provoquée par une augmentation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de type 1 (NHE-1) induite par l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  (Brisson et al., 2011). Il a récemment été montré une colocalisation du canal  $\text{Na}_v1.5$  et de l'échangeur NHE-1 dans des radeaux lipidiques membranaires particuliers riches en cavéoline-1 nommés cavéoles (Brisson et al., 2011).

### C. *Rôles des sous-unités $\beta$ dans les cellules cancéreuses*

Les canaux sodiques sont exprimés dans des cellules cancéreuses humaines et leur activité est corrélée à l'invasivité cellulaire et à la formation de métastases. Des ARNm codant pour les quatre

sous-unités  $\beta$  sont exprimés dans différents types de cellules cancéreuses : mammaires (Gillet et al., 2009), prostatiques (Diss et al., 2008), pulmonaires (Roger et al., 2007) et du col de l'utérus (Hernandez-Plata et al., 2012) (tableau 2).

**Tableau 2 :** Expression en ARNm des sous-unités  $\beta$  dans différents types de cancers.

Toutes les sous-unités  $\beta$  sont exprimées dans les tissus cancéreux étudiés (sein, poumons, prostate, col de l'utérus) à l'exception de la sous-unité  $\beta 3$  qui n'est pas exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires.

Gène	ARNm	Type de cancer	Références
<i>SCN1B</i>	$\beta 1$	mammaire prostatique pulmonaire col de l'utérus	(Gillet et al., 2009) (Diss et al., 2008) (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007) (Hernandez-Plata et al., 2012)
<i>SCN2B</i>	$\beta 2$	mammaire prostatique pulmonaire col de l'utérus	(Gillet et al., 2009) (Diss et al., 2008; Jansson et al., 2014; Jansson et al., 2012) (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007) (Hernandez-Plata et al., 2012)
<i>SCN3B</i>	$\beta 3$	prostatique pulmonaire col de l'utérus	(Diss et al., 2008) (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007) (Hernandez-Plata et al., 2012)
<i>SCN4B</i>	$\beta 4$	mammaire prostatique pulmonaire col de l'utérus	(Gillet et al., 2009) (Diss et al., 2008) (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007) (Hernandez-Plata et al., 2012)

La sous-unité  $\beta 1$  est l'isoforme majoritairement exprimée dans les quatre types de tissus cancéreux étudiés (prostate, sein, poumons et col de l'utérus). En effet, dans le cancer du col de l'utérus, les ARNm des quatre sous-unités sont exprimés mais celui de  $\beta 1$  semble être le plus abondant. Son expression est augmentée dans les biopsies de cancer de col de l'utérus ainsi que dans les cultures primaires par rapport à des tissus sains. L'expression des transcrits de  $\beta 2$  et  $\beta 4$  est équivalente et leur expression semble très diminuée dans les cultures primaires de cellules cancéreuses du col de l'utérus. Enfin, l'ARNm de  $\beta 3$  est très peu exprimé et ne semble pas varier suivant le type de tissu (Hernandez-Plata et al., 2012). La protéine  $\beta 1$  semble jouer un rôle important dans les cellules cancéreuses pulmonaires non à petites cellules et dans les cellules cancéreuses mammaires. Deux études montrent que, dans ces deux types de cancer,  $\beta 1$  est plus faiblement exprimée dans les cellules hautement invasives (Campbell et al., 2013; Chioni et al., 2009). De plus, un siRNA dirigé spécifiquement contre l'expression de  $\beta 1$  entraîne, dans les deux types de cancer, une diminution de l'adhésion cellulaire à une matrice *in vitro*. Les auteurs associent donc l'agressivité des cellules cancéreuses à la diminution d'expression de  $\beta 1$  qui induit une diminution de l'adhésion cellulaire. En revanche, la surexpression de  $\beta 1$  dans une étude *in vivo* de xéno greffe orthotopique augmente la croissance de la tumeur primaire (augmentation de la bioluminescence et du volume tumoral) et

diminue la survie des souris (Nelson et al., 2014). La surexpression de  $\beta 1$  induit également une augmentation du nombre des métastases pulmonaires et hépatiques. Une analyse des cellules de la tumeur primaire décrit un rôle de  $\beta 1$  dans l'apoptose et l'angiogénèse : la surexpression de  $\beta 1$  réduirait de 85% le nombre de cellules apoptotiques en augmentant leur résistance et favoriserait l'angiogénèse. Une étude *in vitro* complémentaire montre une augmentation de la sécrétion de VEGF dans les cellules surexprimant  $\beta 1$  (Nelson et al., 2014).

Enfin, les quatre sous-unités  $\beta$  sont exprimées dans les cellules cancéreuses de prostate humaine. La sous-unité  $\beta 1$  est toujours la plus abondante et la quantité d'ARNm de  $\beta 4$  semble inversement proportionnelle au potentiel métastatique des cellules : *SCN4B* est fortement exprimée dans les cellules LNCaP, peu invasives et plus faiblement exprimé dans les cellules PC3 ou PC-3M hautement invasives (Diss et al., 2008). Par ailleurs, une surexpression de la protéine  $\beta 2$  augmente la migration et l'invasion des cellules LNCaP (Jansson et al., 2012). Cet effet est associé à un changement morphologique des cellules : elles deviennent plus allongées et ont un volume cellulaire diminué, la longueur des prolongements membranaires augmente et l'adhésion cellulaire est plus forte (Jansson et al., 2012). Dans un autre modèle de co-culture *ex vivo*, le rôle de la sous-unité  $\beta 2$  dans la migration des cellules cancéreuses LNCaP a été étudié en fonction de l'innervation de la glande prostatique. En effet  $\beta 2$ , augmente la migration et l'invasion de ces cellules lorsqu'elles sont placées sur une matrice de laminine, molécule d'adhésion neuronale. La surexpression de  $\beta 2$  favoriserait donc l'association des cellules cancéreuses prostatiques aux nerfs périphériques afin de promouvoir la colonisation des autres tissus (Jansson et al., 2014).

Il a également été montré que l'expression de  $\beta 3$  améliore la sensibilité des cellules aux agents anti-cancéreux en augmentant leur sensibilité à l'apoptose. En effet, le traitement de cellules cancéreuses de colon par un agent anti-cancéreux induit l'expression de  $\beta 3$  (Adachi et al., 2004). Plus précisément, il est décrit que le gène *SCN3B* est inductible par la p53 (Adachi et al., 2004), une protéine mutée et inactive dans la moitié des cancers chez l'Homme (Lane and Benchimol, 1990). Lors de la carcinogénèse, les altérations du gène de la p53 diminueraient l'expression de  $\beta 3$  et favoriserait la résistance des cellules cancéreuses aux agents de chimiothérapie.

## Objectifs de la thèse

---

Ma thèse a porté sur l'étude de l'implication des canaux sodiques  $\text{Na}_v1.5$  et de la sous-unité auxiliaire  $\beta4$  dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*. Je me suis intéressée : 1) aux mécanismes par lesquels  $\text{Na}_v1.5$  module l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE-1 et conduit à la formation et l'activité des invadopodes ; 2) à la possibilité d'un ciblage pharmacologique de  $\text{Na}_v1.5$  *in vivo* pour prévenir ou ralentir la formation des métastases ; 3) au rôle que jouent les sous-unités auxiliaires  $\beta$  des canaux  $\text{Na}_v$  dans ce phénomène.

Dans le chapitre suivant nous aborderons les techniques utilisées au cours de cette thèse.

Deuxième partie :  
Matériels et méthodes

# I. Lignées cellulaires

---

Les lignées de cellules cancéreuses humaines utilisées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC).

## A. Cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines

Nous avons utilisé deux lignées de cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines. Les cellules MDA-MB-231 (référence ATCC® HTB-26™) sont issues d'un épanchement pleural d'un adénocarcinome mammaire chez une femme (Cailleau et al., 1974). Ces cellules sont dites "triples négatives", c'est-à-dire qu'elles n'expriment pas de récepteurs hormonaux (ni aux œstrogènes, ni à la progestérone) et ne surexpriment pas les récepteurs de type 2 du facteur de croissance épidermique humain, HER2 (Holliday and Speirs, 2011; Wright et al., 1997). Les cellules MDA-MB-231 expriment des canaux sodiques dépendants du voltage  $Na_v1.5$  qui sont fonctionnels et sont à l'origine d'un courant sodique (Roger et al., 2003). Les cellules MDA-MB-468 (référence ATCC® HTB-132™) sont également issues d'un épanchement pleural d'un adénocarcinome mammaire ((Cailleau et al., 1978) puis caractérisation par (Wang et al., 1997). Elles sont également "triples négatives" mais différent des cellules MDA-MB-231 par une absence d'expression de canaux sodiques fonctionnels (Roger et al., 2003).

Les propriétés de prolifération, de migration et d'invasivité de ces deux lignées ont été décrites *in vitro* (Johnson et al., 1993; Long and Rose, 1996; Thompson et al., 1992). Ces deux types cellulaires ont la capacité de former des métastases *in vivo* lorsqu'elles sont injectées à des souris immunodéprimées (Pille et al., 2005; Sano et al., 2012).

### 1. Cellules épithéliales cancéreuses pulmonaires humaines

Nous avons également utilisé deux lignées de cellules épithéliales cancéreuses pulmonaires humaines dites "non à petites cellules". Les cellules H460 (référence ATCC® HTB-177™) sont issues d'un épanchement pleural d'un carcinome pulmonaire (Banks-Schlegel et al., 1985) et les cellules A549 (référence ATCC® CCL-185™) sont issues d'un carcinome bronchio-alvéolaire (Giard et al., 1973). Ces deux lignées ont été choisies pour leurs différences électrophysiologiques et leurs propriétés d'invasion. En effet, il a été décrit un courant sodique impliqué dans l'invasivité des cellules H460 et non dans les cellules A549 (Roger et al., 2007). De plus, les cellules H460 ont une

capacité invasive supérieure à celle des cellules A549 et ont un pouvoir métastatique *in vivo* plus élevé (McLemore et al., 1987; Roger et al., 2007).

## 2. Lignées cellulaires transformées génétiquement

Afin de pouvoir suivre *in vivo* de la colonisation des organes par les cellules cancéreuses mammaires humaines dans un modèle murin de xénogreffes, la lignée MDA-MB-231 a été modifiée génétiquement pour exprimer le gène de la luciférase (MDA-MB-231-Luc). Nous sommes partis de cette lignée MDA-MB-231-Luc pour réaliser d'autres modifications génétiques et obtenir de nouvelles lignées cellulaires stables. Pour cela, nous avons construit différents plasmides (Cf. Partie II- C) codant pour l'expression d'un petit ARN en épingle à cheveu ou encore "small hairpin RNA" (shRNA) avec l'aide du Dr Virginie Joulin (UMR 1009, Institut Gustave Roussy), du Pr Jean Christophe Pagès, Dr Christine Collin et du Dr Anne Prel (Laboratoire INSERM U966, Tours). Une première séquence appelée shRNA "random" (shRD) a été construite pour servir de contrôle. Ce shRNA ne reconnaît aucune séquence d'ARN connue. Les cellules transduites avec ce shRD ont été nommées MDA-MB-231-Luc-shRD. Un second shRNA a été développé, dirigé contre l'expression de la sous-unité  $\alpha$  de NaV1.5 (shNaV1.5) et a permis de créer la lignée cellulaire MDA-MB-231-Luc-shNaV1.5. Un troisième shRNA, dirigé contre l'expression de la sous-unité auxiliaire  $\beta 4$  (sh $\beta 4$ ), a permis d'obtenir la lignée MDA-MB-231-Luc-sh $\beta 4$ . Nous avons également construit un plasmide (p $\beta 4$ ) qui, après transduction des cellules MDA-MB-231-Luc, a permis de surexprimer la protéine  $\beta 4$  créant ainsi la lignée MDA-MB-231-Luc-surex $\beta 4$  (Cf. Partie II- C). Chacun des plasmides cités précédemment contient également le gène codant pour la protéine fluorescente verte (GFP). Les nouvelles lignées créées expriment donc également cette protéine fluorescente verte.

## B. Protocoles expérimentaux utilisés en culture cellulaire

### 1. Solutions et matériels utilisés

La culture cellulaire est une étape déterminante pour les différentes expérimentations qui en découlent et doit donc être réalisée dans des conditions optimales pour éviter tout risque de contamination et permettre la reproductibilité de chaque expérience.

Les cellules sont maintenues en culture dans un milieu nommé Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contenant 4,5 g/L de glucose, des sels minéraux, des acides aminés (dont la L-glutamine) et des vitamines. Afin d'apporter les facteurs de croissance et les cytokines nécessaires à la prolifération

des cellules, le milieu est supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Ce sérum peut aussi être un inconvénient dans la culture cellulaire puisqu'il contient une importante variété de facteurs de croissance, d'hormones, dont on ne connaît pas la composition exacte. Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture stériles et traités physiquement en surface pour permettre une meilleure adhésion cellulaire (BD Biosciences). Elles sont ensuite placées à 37°C dans un incubateur dans lequel l'atmosphère est saturée en eau et contient 5% de CO<sub>2</sub>. Le maintien du pH du milieu de culture à une valeur de 7,4 est permis grâce à l'apport en CO<sub>2</sub> et au tampon carbonate d'après l'équilibre suivant :  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ . Suivant les expériences et la quantité de cellules souhaitée nous utiliserons différentes tailles de flacon : 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, ou 175 cm<sup>2</sup>.

## 2. Cryogénéisation et décryogénéisation des lignées cellulaires

Afin de maintenir leur pérennité, les cellules sont cryogénisées. Pour cela, une fois trypsinées et centrifugées, les cellules sont reprises dans un milieu cryoprotecteur contenant 60% de DMEM, 30% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour limiter la formation de cristaux au moment de la congélation. La suspension cellulaire, à une concentration d'environ 1 à 1,5.10<sup>6</sup> cellules par mL, est alors aliquotée à raison de 1 mL par cryotube. Après 15 min à température ambiante pour permettre l'entrée du DMSO dans les cellules, les cryotubes sont tout d'abord placés dans un congélateur à -80°C pendant au moins 24h, afin que la congélation soit progressive, avant d'être transférés dans l'azote liquide à -196°C pour une conservation à long terme.

Lors de la décryogénéisation les cryotubes sont placés sous un filet d'eau tempérée. Les cellules sont ensuite transférées dans un flacon contenant le milieu de culture préalablement placé dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> afin d'équilibrer la température à 37°C et surtout le pH à 7,4. Afin d'éliminer le DMSO, non dénué d'effets toxiques sur les cellules, le milieu de culture est changé le lendemain.

## 3. Trypsination des lignées cellulaires

Afin que les cellules n'atteignent pas un niveau de confluence trop élevé pour éviter les inhibitions de contact et pouvoir les réensemencer à plus faible densité ou pour les recueillir pour une expérience, les cellules doivent être décollées de leur support. La trypsine est une enzyme protéolytique qui dissocie les liaisons entre cellules ou entre les cellules et le support. Il est nécessaire, au préalable, d'éliminer les protéines contenues dans le sérum qui pourraient empêcher l'action de la trypsine. Pour cela, les cellules sont lavées de leur milieu par une solution saline nommée Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), qui ne contient ni calcium ni magnésium. Les cellules sont ensuite décollées de leur support à l'aide d'une solution contenant de la trypsine (500 mg/L) qui va

hydrolyser les protéines d'adhésion, et de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA ; 200 mg/L) qui va, en chélatant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , déstabiliser les jonctions intercellulaires et va renforcer l'activité de l'enzyme. Du DMEM complétement avec 5% de SVF est ensuite ajouté afin de bloquer l'activité de la trypsine. Les différents protocoles expérimentaux abordés dans cette thèse nécessitent de connaître la concentration cellulaire de la suspension. On détermine cette concentration à l'aide d'un hématimètre. La cellule de Malassez est le modèle d'hématimètre utilisé. Il s'agit d'une lame de verre comportant un quadrillage gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés. Le volume d'un petit carré étant de 0,01  $\mu\text{L}$ , en comptant 10 carrés, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellules par mL. Les cellules sont ensuite ensemencées à la densité souhaitée, en fonction des expériences, dans les flacons.

#### **4. Evaluation de la viabilité cellulaire**

##### *a) Principe*

La viabilité des lignées cellulaires est évaluée par un test colorimétrique nommé test MTT. Le sel jaune de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est réduit par les succinates déshydrogénases mitochondriales et cytosoliques uniquement actives dans les cellules vivantes et forme alors de cristaux de formazan bleu-violet, solubles uniquement dans le DMSO. Le nombre de cellules vivantes sera proportionnel à l'intensité de la coloration.

##### *b) Méthode*

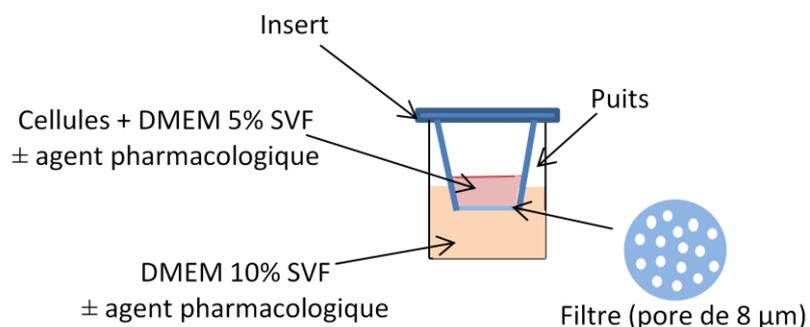
Pour ce test, les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits (10 000 cellules par puits). Les cellules sont alors laissées en culture durant une période pouvant varier de 24 heures (évaluation de la cytotoxicité) à 5 jours (évaluation de la prolifération cellulaire). A la fin de cette période, le milieu de culture est remplacé par 400  $\mu\text{L}$  de MTT (dilué à 0,5 mg/mL dans du milieu de culture). Les cellules sont remises à l'incubateur pendant 1 heure. Le MTT est ensuite retiré et remplacé par 200  $\mu\text{L}$  de DMSO puis la plaque est placée sous agitation à l'abri de la lumière pendant 20 min. On transfère 100  $\mu\text{L}$  de solution dans une plaque 96 puits afin de procéder à la lecture de la densité optique (DO) à la longueur d'onde de 570 nm. Les mesures sont faites en triplicata afin de prendre en compte les erreurs de pipetages des cellules ou des solutions, et les valeurs sont relativisées par rapport à la condition contrôle (en absence de la substance testée ou les cellules traitées avec un siRNA contrôle ou shRD).

## 5. Evaluation de la motilité des cellules cancéreuses *in vitro* : tests de migration et d'invasivité

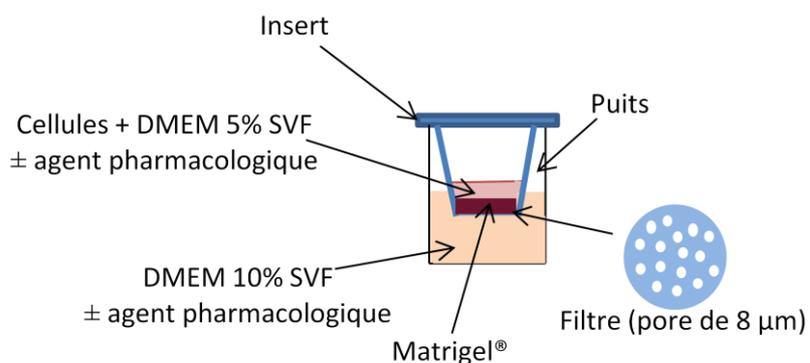
Les cellules cancéreuses ont la capacité de dégrader la matrice extracellulaire et de migrer afin de s'échapper de la tumeur primaire et coloniser d'autres tissus. Deux tests *in vitro* nous permettent d'évaluer ces aptitudes. Nous utilisons des inserts dits "de migration" qui évaluent la capacité des cellules à se déformer et se déplacer afin de passer à travers un filtre en polyéthylène-téréphtalate aux pores de 8 µm de diamètre (BD Falcon Cell culture Inserts ; Réf 353097 ; Corning). Des inserts dits "d'invasion" permettent d'évaluer la capacité des cellules à dégrader une matrice composée de Matrigel™, placée au dessus du filtre, puis migrer de la même façon que précédemment à travers les pores de 8 µm de diamètre (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber ; Réf 354480 ; Corning).

Les cellules sontensemencées dans les inserts à une densité de 40 000 cellules par insert pour le test de migration et 60 000 cellules par insert pour le test d'invasion, dans un volume final de 200 µL. Chaque condition est réalisée en triplicata. Un gradient est créé avec un milieu chimio-attractant (DMEM supplémenté avec 10 % de sérum) placé dans le compartiment inférieur. Un agent pharmacologique peut être ajouté à ces expériences en conservant une concentration identique dans les deux compartiments (figure 16). Après 24 heures dans l'incubateur, les inserts sont récupérés et placés dans du DPBS afin de retirer le SVF. Les cellules sont ensuite fixées au méthanol 70 % (pendant 10 minutes) puis les noyaux sont colorées au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole ; réf D1306 ; Fisher Life Technologies) pendant 2 min. Les inserts sont lavés deux fois dans l'eau distillée et les cellules de la face supérieure de l'insert sont éliminées avec des cotons-tiges afin de ne compter que les cellules ayant traversé le filtre et qui adhèrent à la face inférieure. Le DAPI émet une fluorescence bleue brillante à une longueur d'onde de 460 nm après une excitation à 358 nm. Les cellules peuvent alors être détectées (comptage des noyaux) à l'aide d'un microscope à fluorescence, 8 photos sont prises par inserts (objectif x10) et sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA) (figure 17). Le nombre de noyaux par photos, représentant le nombre de cellules, est alors compté automatiquement. On calcule la moyenne des triplicats pour évaluer le nombre de cellules par insert. Cette moyenne est enfin relativisée à la condition contrôle.

### Test de migration :



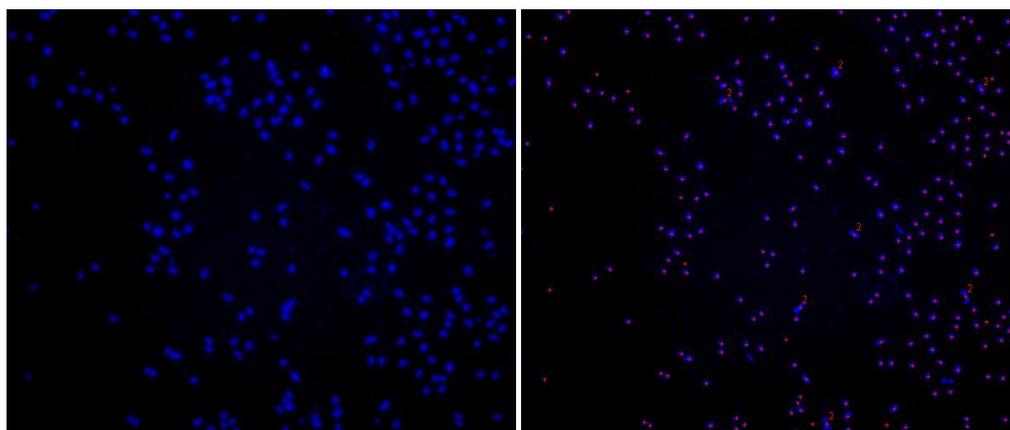
### Test d'invasivité :



**Figure 16 :** Représentation schématique de l'évaluation *in vitro* de la motilité des cellules cancéreuses : test de migration et d'invasivité.

A/

B/



**Figure 17 :** Détection et analyse des noyaux des cellules marqués au DAPI.

A/ Exemple de photographie obtenue en microscopie optique à fluorescence après coloration des noyaux des cellules MDA-MB-231 au DAPI (x100). B/ Image, au même grossissement, obtenue après analyse et modification par le logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA). Les points rouges correspondent aux noyaux comptés.

## II. Biologie moléculaire

---

### A. *Etude de l'expression des ARN messagers par PCR*

Afin d'étudier le niveau d'expression de certains gènes d'intérêt dans les lignées cellulaires étudiées, nous avons utilisé la technique de réaction de polymérisation en *chaîne* (PCR, polymerase chain reaction) qui nécessite trois étapes clés. La première étape va permettre l'extraction et la purification des ARN totaux des cellules. La deuxième étape conduit à l'obtention d'ADN complémentaire synthétisé à partir d'ARNm. La séquence d'intérêt est amplifiée dans une troisième étape de PCR.

#### 1. Extraction des ARN totaux

Cette première étape est réalisée, en suivant les recommandations du fournisseur, avec le kit Total RNA isolation Nucleospin® RNA II (Réf : 740955.250 ; Macherey-Nagel). Après trypsination, les cellules sont centrifugées (700 x g pendant 5 min) et le culot est lavé du milieu de culture à l'aide de DPBS. A la fin de la deuxième centrifugation le surnageant est retiré et les cellules sont lysées par un tampon contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol ainsi que de la guanidine thiocyanate. Ce tampon va également inactiver les ribonucléases (RNAses) et donc préserver les ARN. De l'éthanol 70% est ajouté au lysat (v/v) ce qui va créer les conditions appropriées pour favoriser la liaison de l'ARN à une membrane de silice placée dans une colonne. Un traitement de 15 min avec des désoxyribonucléases (DNAses) permet d'éliminer l'ADN génomique contaminant pouvant s'être fixé sur la membrane. Trois lavages successifs avec deux tampons différents éliminent les sels et macromolécules cellulaires de la membrane de silice. Les ARN totaux purifiés sont alors élués avec de l'eau sans RNAses ou DNAses. Ces ARN peuvent ainsi être conservés à -20°C à court terme ou à -80°C pour un stockage à long terme.

#### 2. Transcription inverse

Cette technique permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) synthétisés à partir d'ARN. Pour cela nous utilisons un kit contenant tous les éléments nécessaires à la rétrotranscription (PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) ; Réf TAKRR037Q ; Ozyme). Des amorces de six désoxyribonucléotides (pDN6) ayant des séquences aléatoires ainsi que des oligonucléotides désoxythymidine qui vont s'apparier de façon complémentaire à tous les brins d'ARN présents dans la solution. L'enzyme, une ADN polymérase ARN dépendante (ou reverse transcriptase), va alors

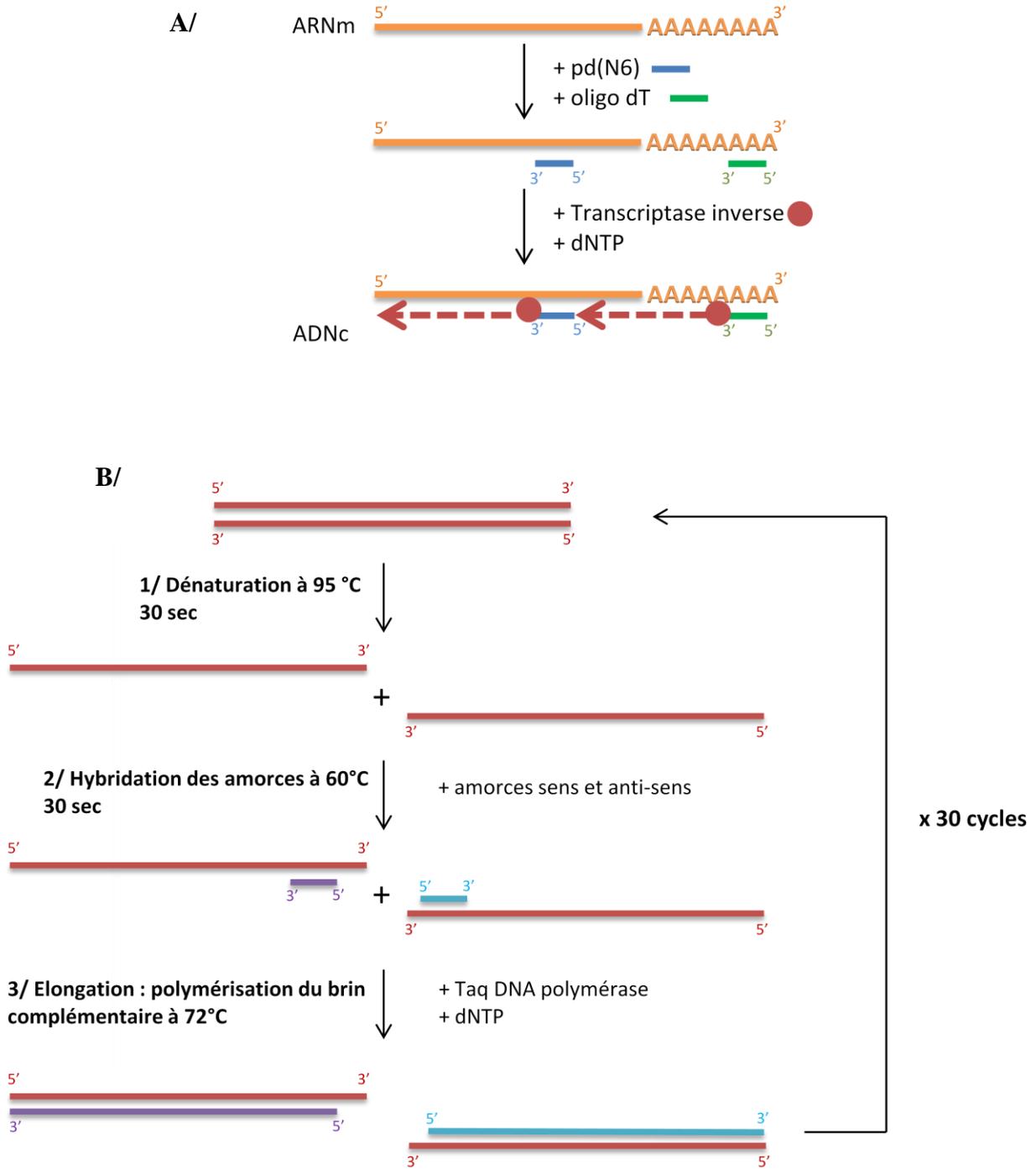
synthétiser un brin d'ADNc. Après 15 min à 37°C, tous les ARN seront copiés en ADNc (figure 18, A/). L'enzyme est rendue inactive après 5 secondes à 85°C.

### 3. Réaction de polymérisation en *chaîne*, PCR

#### a) *Principe*

La réaction de polymérisation en *chaîne* ou PCR est une technique développée en 1985 par Kary Mullis (Mullis et al., 1986). Elle permet d'amplifier *in vitro*, sans clonage, une séquence d'ADNc spécifique et en très grand nombre. De cette technique découlent deux aspects : le premier est une information qualitative de l'expression ou non d'une séquence d'intérêt (PCR non quantitative) ; le second donne une information quantitative de l'expression d'un gène (PCR quantitative en temps réel).

La PCR, comme son nom l'indique, est une série de réactions, répétées en boucle, permettant la duplication d'une séquence d'ADNc de façon exponentielle. Cette série de réactions se décline en trois étapes : 1) il est nécessaire de dénaturer les doubles brins d'ADN pour obtenir de l'ADNc simple brin. Cette étape permet alors 2) l'appariement entre l'ADNc et les amorces oligonucléotidiques. La dernière étape 3) consiste à l'élongation de l'amorce pour constituer le brin complémentaire de l'ADNc cible par une enzyme de polymérisation, la Taq polymérase, en présence de désoxynucléotides et de MgATP. Le fragment d'ADN amplifié est nommé amplicon. La Taq polymérase (*Thermus aquaticus* polymérase) est une ADN polymérase particulière car elle résiste à de très fortes températures. Ces trois étapes sont alors répétées en boucle, au minimum 30 cycles (figure 18, B/).



**Figure 18 :** Etude de l'expression des ARNm.

A/ Transcription inverse B/ la réaction de polymérisation en *chaîne* constituée de trois étapes répétées en boucle.

## b) *Choix des amorces*

La PCR nécessite un couple d'amorces oligonucléotidiques qui est spécifique de la séquence d'ADN à amplifier. Le choix et la conception des amorces est une étape importante puisque la qualité des amorces est directement liée à la réussite et à la qualité de l'amplification du gène d'intérêt. Les séquences d'ADNc de nos gènes d'intérêts sont obtenues à partir d'une banque de donnée (Ensembl Genome Browser <http://www.ensembl.org/index.html>). Le logiciel en ligne Primer3 permet d'obtenir, à partir de la séquence d'ADNc à amplifier, les séquences des couples d'amorces les mieux adaptées et caractérisées par différents critères imposés tels que la taille du fragment amplifié, la taille des amorces (environ 20 nucléotides), le pourcentage de GC (au minimum 50%) et la température d'hybridation des amorces qui doit être proche de 60°C. Si possible, chacune des amorces doit s'hybrider, de façon complémentaire, sur deux exons différents. Il sera ainsi possible de s'assurer qu'aucune contamination avec de l'ADN génomique n'est présente puisque le fragment amplifié contenant les séquences introniques serait soit plus grand, soit inexistantant (si l'intron est très grand, le temps nécessaire à son amplification sera insuffisant à chaque cycle). Enfin, il est nécessaire de vérifier la spécificité des couples d'amorces sélectionnées pour notre gène d'intérêt uniquement à l'aide du site Blast (BLAST pour Basic Local Alignment Search Tool ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les amorces ainsi créées sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés en PCR et qPCR et tailles attendues des fragments amplifiés.

AMORCE	Gène	ARNm	Séquence 5' → 3'	Taille amplicon
Sens	SCN1A	Na <sub>v</sub> 1.1	TTCATGGCTTCCAATCCTTC	178 pb
anti-sens			TAGCCCCACCTTTGATTTTG	
Sens	SCN2A	Na <sub>v</sub> 1.2	GCCAGCTTATCAATCCCAA	192 pb
anti-sens			TCTTCTGCAATGCGTTGTTC	
Sens	SCN3A	Na <sub>v</sub> 1.3	CAAAGGGAAGATCTGGTGGGA	115 pb
anti-sens			AAAGGCCAATGCACCACTAC	
Sens	SCN4A	Na <sub>v</sub> 1.4	TCAACAACCCCTACCTGACC	148 pb
anti-sens			ACGGACGAGTTCCCATCATA	
Sens	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	CACGCGTTCACCTTCCTTC	

<b>anti-sens</b>			CATCAGCCAGCTTCTTCACA	208 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN8A</i>	Na <sub>v</sub> 1.6	CGCCTTATGACCCAGGACTA	
<b>anti-sens</b>			GTGCCTCTTCTGTGCTTC	247 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN9A</i>	Na <sub>v</sub> 1.7	GGCTCCTGTTTTCTGCAAG	
<b>anti-sens</b>			TGGCTTGGCTGATGTTACTG	196 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN10A</i>	Na <sub>v</sub> 1.8	ACCTGGTGGTGCTTAACCTG	
<b>anti-sens</b>			TGCTGAAGAAGCTGCAAAGA	168 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN11A</i>	Na <sub>v</sub> 1.9	CTGTGGTCCTGGTCATTGTG	
<b>anti-sens</b>			TGCATTGCTTCTTGCATAC	233 pb
<b>Sens</b>	<i>HPRT1</i>	HPRT1	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	
<b>anti-sens</b>			TATGTCCCCTGTTGACTGGT	119 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN1B</i>	β1	TGCGCTATGAGAATGAGGTG	
<b>anti-sens</b>			GAAGAAGAGCAGGCGGTAGA	176 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN2B</i>	β2	GTACGATGTGTCGGTGATGC	
<b>anti-sens</b>			AGATGACCACAGCCAGGAAG	203 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN3B</i>	β3	GAGGGCGGTAAAGATTTCTT	
<b>anti-sens</b>			AGAGGCCAGAGTCGTTTCTT	154 pb
<b>Sens</b>	<i>SCN4B</i>	β4	GAAGTCTGACCCCAAGGTGA	
<b>anti-sens</b>			CACATGGCAGGTGTATTGTC	139 pb

### c) *PCR non quantitative*

Nous avons utilisé le kit de PCR : puREtaq Ready-To-Go PCR Beads (réf : 27-9557-01, Amersham Biosciences, UK). Il se présente sous la forme de billes lyophilisées contenant tous les acteurs nécessaires : les quatre désoxyribonucléotides tri-phosphate (dNTP) nécessaires à la synthèse du brin complémentaire d'ADN, 2,5 unités de puREtaq DNA polymérase<sup>TM</sup>, de l'albumine sérique bovine (BSA) et le tampon (10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl et 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>). On ajoute alors 100 ng d'ADNc issu de l'étape de transcription inverse, puis le couple d'amorces (sens et anti-sens ; tableau 1) utilisé à une concentration finale de 0,2 μM. Le volume final est ajusté à un volume de 25 μL avec

de l'eau sans RNase ni DNase. Pour réaliser les 30 à 40 cycles décrits précédemment, nous utilisons un thermocycleur (SensoQuest, Dutscher).

Les fragments synthétisés par la PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela un mélange est préparé contenant 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc et 1  $\mu\text{L}$  de tampon de charge (Blue/Orange, Promega). Ce tampon permet de suivre l'électrophorèse puisqu'il contient 3 colorants au profil de migration différent : le xylène cyanol FF ( $\approx$  4 kb), le bleu de bromophénol ( $\approx$  300 pb) et le orange G ( $\approx$  50 pb). Il contient également du glycérol pour permettre de déposer les échantillons dans le fond du puits. Un gel contenant 1% d'agarose est préparé dans un tampon Tris Acétate EDTA (TAE Réf. 15558-026 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) et contenant 1 % de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence sous les rayons ultra-violet (UV). Afin de vérifier la taille des amplicons, un marqueur de taille de 100 bp (100pb DNA ladder réf : G2101, Promega, USA) est déposé dans un des puits, en même temps que les échantillons. La migration est réalisée pendant 30 min à 100 V. Les fragments d'intérêts amplifiés lors de la PCR sont révélés sous une lampe UV ou avec une caméra (GelDoc 2000, BioRad, France). L'acquisition se fait grâce au logiciel Quantity One (BioRad, France).

#### *d) PCR en temps réel*

La PCR quantitative en temps réel est une évolution de la PCR conventionnelle basée sur la détection et la quantification de la fluorescence émise par un agent intercalant, ici le SYBR GREEN, dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN. Le SYBR Green est une molécule qui se fixe, au niveau du petit sillon, à l'ADN double brin lors de sa formation durant la phase d'élongation. La fluorescence émise est alors directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin et est détectée à chaque fin de cycle par un thermocycleur équipé d'une lampe fluorescente (MyIQ, BioRad).

Pour réaliser cette technique, deux mélanges réactionnels sont préparés : le premier contenant l'ADNc à une concentration de 10 ng/ $\mu\text{L}$  et le deuxième se compose d'une solution de SYBR GREEN (réf TAKRR420W, Takara, Ozyme, France) contenant dans un tampon, la Taq DNA polymérase et les dNTP et à laquelle sont rajoutées les deux amorces sens et anti-sens (tableau 1) à une concentration finale de 0,2  $\mu\text{M}$ . Dans une plaque de 96 puits spécifique pour qPCR, les échantillons seront déposés en triplicat pour assurer la reproductibilité et écarter toute erreur de pipetage (10  $\mu\text{L}$  de solution d'ADNc puis 15  $\mu\text{L}$  de mélange SYBR GREEN/amorces par puits).

Le programme utilisé est le suivant :

Activation de l'enzyme :	2 min	95°C	
Dénaturation :	15 sec	95°C	← X 40 cycles
Hybridation :	30 sec	60°C	
Elongation :	30 sec	72°C	

Les données sont ensuite récupérées et analysées avec le logiciel MyIQ (BioRad, France). A chaque cycle, l'appareil enregistre une valeur de fluorescence correspondant à la quantité d'amplicons synthétisés. Plus la quantité d'ADNc recherché est élevée dans l'échantillon, moins il faudra de cycles de PCR pour détecter une fluorescence au dessus du bruit de fond (Gibson et al, 1996). On définit ce point comme étant le cycle seuil (Ct, cycle threshold) qui est au début de la phase exponentielle d'amplification. Pour chacun des puits de la plaque sera alors attribué un Ct. On utilise également des amorces spécifiques d'un gène dit de référence dont l'expression ubiquitaire n'est pas modifiée par un traitement. Dans cette étude nous avons utilisé comme référence le gène de l'hypoxanthine-guanine phospho-ribosyl-transférase (HPRT). La valeur de Ct du gène cible est alors corrigée par la valeur de Ct du gène de référence. On obtient ainsi un  $\Delta Ct$  qui est égal à :  $Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{HPRT})$ . Le  $\Delta Ct$  du gène cible dans les conditions de traitement est alors relativisé par rapport au  $\Delta Ct$  du gène cible de la condition témoin. Le  $\Delta\Delta Ct$  est ainsi obtenu :  $\Delta Ct(\text{gène cible condition de traitement}) - \Delta Ct(\text{gène cible condition témoin})$ . Enfin, une quantité relative Q peut être calculée en fonction de l'efficacité des amorces (égale à 2 dans l'absolu) et du  $\Delta\Delta Ct$  par la formule suivante :  $Q = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## *B. Transfection transitoire par des ARN interférents*

La transfection désigne un processus de transfert de séquence nucléotidique exogène dans des cellules eucaryotes. La transfection n'est pas médiée par un virus, par opposition à la transduction. Dans cette étude, des ARN interférents (RNAi) sont utilisés afin d'inhiber spécifiquement l'expression d'une protéine. Les "small interfering RNA" (siRNA) sont de courtes séquences d'ARN double brin (20-25 nucléotides) ciblant spécifiquement un ARNm et pouvant être produit de façon endogène par les cellules ou introduit par transfection.

La production endogène de siRNA est due à une endoribonucléase cellulaire, DICER, clivant les ARN doubles brins en de courts segments d'une vingtaine de nucléotides (Hutvagner G et al. 2001, Ketting RF et al. 2001). Pour cela, cette enzyme possède un domaine ARN hélicase, un domaine PAZ (qui servira à la liaison avec le complexe RISC), deux domaines RNase III, ainsi qu'un motif de liaison à l'ARN double brins.

Le groupement siRNA-DICER se fixe ensuite au complexe multiprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) grâce à la protéine Argonaute, une endonucléase du complexe RISC. La protéine Argonaute possède un domaine PAZ (Piwi, Argonaute, Zwill) qui s'apparie avec le domaine PAZ de DICER. Le complexe RISC contient également une hélicase permettant de dissocier l'ARN interférent double brins. Ainsi, seul le brin complémentaire reste fixé au complexe RISC tandis que le brin non complémentaire de l'ARN est dégradé. Deux cas peuvent ensuite se présenter : dans le cas d'une reconnaissance et d'une complémentarité parfaite entre le complexe siRNA-RISC et un nouvel ARNm, l'enzyme Argonaute clive alors l'ARNm dont les différents fragments seront dégradés par la suite, par des exonucléases cellulaires. Il est également possible que la complémentarité entre le complexe siRNA-RISC et un nouvel ARNm soit imparfaite, RISC va alors seulement réprimer la traduction. Malgré tout, ces deux processus conduisent à l'extinction de l'expression des protéines d'intérêt (figure 20, étape 5).

Les cellules MDA-MB-231-Luc ont été transfectées par différents siRNA dirigés spécifiquement contre les ARNm de  $Na_v1.5$  (mélange de trois siRNA, si $Na_v1.5$ , réf sc-42640, Santa Cruz, Tebu-Bio, France) ou dirigés contre les ARNm de chaque sous-unité  $\beta$  ( $\beta 1$ , mélange de deux siRNA, si $\beta 1A$  OR7041 et si $\beta 1B$  OR7401 ;  $\beta 2$  si $\beta 2$  OU7371 ;  $\beta 4$  si $\beta 4$  OU7401, Abnova, Interchim, France). Un siRNA ne ciblant aucun gène connu (réf sc-37007, Santa Cruz, Tebu-Bio, France ; ou PB8831, Abnova, Interchim, France) a été utilisé comme témoin de transfection (potentiels effets de l'agent de transfection ou de l'introduction de séquences nucléotidiques exogènes). L'agent de transfection utilisé est la Lipofectamine™ (Lipofectamine™ RNAiMAX, Invitrogen, France). C'est un lipide cationique qui encapsule les siRNA (par complémentarité de charges), fusionne avec la membrane plasmique de la cellule et permet la libération des siRNA dans le milieu intracellulaire.

Les transfections ont été réalisées sur des cellules adhérentes, environ 24h après ensemencement, dans des plaques 6 puits (Corning Costar®, Réf 3516, Corning, USA). Pour cela on prépare d'abord une solution de siRNA dans du DMEM sans SVF (avec une concentration finale de 20 nM pour si $Na_v1.5$  et 3 nM pour les siRNA des sous-unités  $\beta$ ) et la lipofectamine (0,2% du volume final). Après 20 minutes d'incubation, pour que les complexes lipofectamine-siRNA se forment, ce mélange est complété avec du milieu de culture contenant 5% de SVF puis déposé sur les cellules. L'efficacité de l'inhibition

d'expression du gène cible est vérifiée par qPCR et / ou par western blotting. ...). Une cinétique a été réalisée (24, 48 ou 72 heures) pour déterminer le temps nécessaire pour avoir une efficacité optimale des différents siRNA. Le temps nécessaire est de 48h pour les siRNA dirigés contre l'expression de  $Na_v1.5$  et de 72h pour les siRNA dirigés contre l'expression des sous-unités  $\beta$ . Par exemple, lors des expériences de migration ou d'invasivité avec les siRNA dirigés contre les sous-unités  $\beta$ , les cellules sont transfectées 24h après ensemencement. Elles sont ensuite trypsinées et ensemencées sur insert 48h après la transfection. L'arrêt des tests de migration et d'invasivité intervient alors 72h après la transfection.

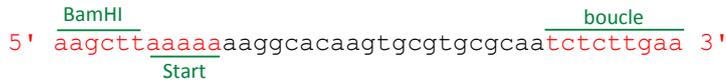
### *C. Construction d'un vecteur lentiviral codant pour un shRNA*

Les lentivirus font partie de la famille des *Retroviridae*. Ils sont d'excellents vecteurs puisqu'ils permettent une expression stable et à long terme d'un transgène. Ils ont également une faible toxicité de par l'absence d'intégration dans les cellules des séquences codantes virales. Les petits ARN en épingle à cheveux ou encore "small hairpin RNA" (shRNA) sont de courtes séquences d'ARN double brin (20-25 nucléotides) synthétisées en permanence par les cellules suite à l'intégration d'une séquence codante dans le génome des cellules hôtes. Les shRNA, précurseur des siRNA, interagissent avec le complexe DICER puis RISC (mécanisme décrit précédemment dans le paragraphe B) et ciblent précisément une séquence particulière d'ARNm (figure 19).

#### **1. Construction des séquences codant pour des shRNA**

Deux couples d'amorces (figure 19) ont été conçus pour établir deux séquences codantes pour deux shRNA. Le premier est dirigé contre l'expression de la sous-unité principale  $\alpha$  de la protéine  $Na_v1.5$  et le second cible l'expression de la sous-unité  $\beta 4$ . Ces couples d'amorces sont constitués de séquences nucléotidiques particulières (figure 19). En 5' de chaque amorce a été insérée une séquence correspondant à un site de restriction enzymatique : sites BamHI sur la séquence sens et HindIII sur la séquence anti-sens. Ces sites de coupure enzymatique serviront, par la suite, à insérer cette séquence avec la bonne orientation dans un plasmide. Les séquences nommées sens et une séquence anti-sens sont palindromiques et spécifiques de l'ARNm cible. Enfin une dernière séquence appelée "boucle" (hairpin) placée en 3' formera, dans la cellule, la boucle du shRNA.

1/ amorces commandées



2/ Appariement des amorces



3/ Remplissage par l'ADN polymérase



4/ Intégration dans différents plasmides dans un vecteur lentiviral

5/ Transduction, intégration génomique

6/ Expression de la séquence dans la cellule

7/ Formation du shRNA



**Figure 19** : Etapes conduisant à la formation d'un shRNA.

Les amorces sens et anti-sens spécifiques de l'ARNm de  $\beta 4$  sont représentées en noir. Les sites enzymatiques (BamHI et HindII) servent à la construction des différents plasmides et la séquence "boucle" fera partie du shRNA.

Les séquences palindromiques sont obtenues sur le principe de l'élongation d'amorces qui s'apparient entre-elles suivant le même principe qu'un cycle de PCR. Pour cela, un mélange est préparé contenant 2  $\mu$ M d'amorces sens, 2  $\mu$ M d'amorces anti-sens, le tampon ThermoPol<sup>®</sup> de l'enzyme, 0,4 mM dNTP, 1 unité de Taq DNA polymérase (M0267L ; New England Biolabs) et complété avec de l'eau pour obtenir un volume final de 50  $\mu$ L. Le mélange est placé dans un thermocycleur avec le programme suivant : dénaturation pendant 5 min à 94°C, hybridation pendant 1 min à 54°C et polymérisation pendant 10 min à 72°C. Le produit de PCR est purifié sur colonne (NucleoSpin Extract II ; Macherey Nagel ; France) afin d'éliminer l'enzyme et les sels contenus dans la solution.

## 2. Clonage de la séquence d'intérêt dans le plasmide pGEM-T-easy

### a) *Etape de ligation*

Les séquences d'ADN sont introduites dans un plasmide pGEM-T-easy (A1360 ; Promega). Cette étape rend le clivage de la séquence par des enzymes de restriction, ici BamHI et HindII, plus efficace contrairement à une coupure enzymatique effectuée sur des extrémités libres. Cette insertion est rendue possible grâce aux deux adénines ajoutées en 3' des brins par la polymérase lors de l'étape d'élongation et aux deux thymines présentes aux extrémités du plasmide pGEM-T-easy. Le site d'insertion de la séquence est situé au milieu du gène de la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) ce qui permettra, après l'étape de transformation bactérienne, de distinguer les bactéries contenant les plasmides ayant intégré la séquence d'intérêt ( $\beta$ -gal négatif) de celles ayant intégré des plasmides réformés sur eux-mêmes ( $\beta$ -gal positif).

Cette étape se fait avec 1  $\mu$ L de produit obtenu après le cycle de polymérisation, le tampon de la ligase, 200 unités de T4 DNA ligase (M0202S ; New England Biolabs), 50 ng de vecteur pGEM-T-easy et qsp 10  $\mu$ L d'eau. Le tout est placé 1 h à 37°C.

### b) *Transformation bactérienne par choc thermique*

La transformation bactérienne permet l'intégration du plasmide contenant la séquence d'intérêt dans une bactérie. En dupliquant leur propre ADN, les bactéries vont dupliquer et donc amplifier le plasmide d'intérêt. Pour ce faire, 2  $\mu$ L du produit de ligation sont ajoutés à des bactéries rendues compétentes par traitement chimique au chlorure de rubidium. Afin de permettre l'insertion du plasmide dans les bactéries on réalise un choc thermique : après une incubation de 30 min dans la glace, le mélange contenant les bactéries et le plasmide est placé pendant 1 min 30 s à 42°C puis remis sur la glace pendant 2 min. Les bactéries sont mises en culture sous agitation (200 rpm) 1 h à 37°C dans un milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression). Les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant une gélose agar-agar. Cette gélose est préparée avec du milieu du milieu LB (Lysogeny broth ; LB-agar) auquel est ajouté un antibiotique correspondant au gène de résistance du plasmide, l'ampicilline (50  $\mu$ g/mL final), ainsi que du X-gal qui est un substrat chromogène de la  $\beta$ -gal. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. La couleur bleue ou blanche des colonies indique si la  $\beta$ -gal est exprimée ou non.

### c) *PCR sur colonies bactériennes*

Chaque colonie est récupérée à l'aide d'une pointe de cône stérile. La colonie choisie est d'abord

repiquée sur une boîte LB-agar afin d'être conservée puis elle est plongée dans un mélange de PCR contenant : le tampon ThermoPol®, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM d'amorce sens (M13F ; GTAAAACGACGGCCAG), 0,2 µM d'amorce anti-sens (M13R ; CAGTATCGACAAAGGAC), 1 unité de Taq DNA polymérase (M0267L ; New England Biolabs) et qsp 50 µL d'eau. La PCR est réalisée avec le programme suivant : activation de l'enzyme à 94°C pendant 2 min puis 30 cycles comprenant la dénaturation pendant 15 sec à 94°C, l'hybridation pendant 30 sec à 50°C et l'élongation durant 30 sec à 72°C enfin une dernière étape de 5 min à 72°C permet de terminer la polymérisation des fragments. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit précédemment et sont ensuite visualisés sous UV. Les colonies positives sont récupérées en milieu liquide LB/ampicilline à partir de la boîte LB-agar pour être amplifiées pendant la nuit à 37°C.

#### *d) Minipréparation d'ADN plasmidique*

La minipréparation d'ADN est une technique permettant d'extraire de l'ADN présent en très faible quantité (inférieure à 5 µg) de bactéries ayant subi une transformation. Le protocole du kit Plasmid DNA Purification Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel) est utilisé pour cette manipulation. Après une centrifugation de 30 sec à 11000 x g, les culots bactériens sont repris dans le tampon A1 (Glucose 0,9%, Tris 6 mM, EDTA 2 mM, Rnase A 100 µg/mL). Les bactéries sont ensuite lysées par le tampon A2 (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Après agitation douce et 5 min d'incubation à température ambiante, le tampon A3 (acétate de potassium) est ajouté afin de neutraliser le pH. Les protéines, l'ADN génomique ainsi que les débris cellulaires sont alors précipités puis éliminés par une centrifugation à 11000 x g pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré et déposé sur une membrane de silice dans une colonne. Un lavage à l'éthanol 96% permet d'éliminer les sels, métabolites et autres macromolécules cellulaires qui n'ont pas précipité. L'ADN est enfin élué dans de l'eau stérile sans RNase ni DNase.

#### *e) Séquençage*

La PCR permet d'avoir une information semi-qualitative de notre insert mais elle ne nous permet pas d'observer des anomalies (mutation, perte de nucléotides) qui peuvent apparaître lors des étapes précédentes. C'est pour cela qu'un séquençage est effectué afin de vérifier l'exactitude de la séquence de notre insert. Pour cela un kit est utilisé : BigDye Terminator V3.1 Sequencing Kit (4337455 Life Technologies, Fisher). On utilise 100 ng d'ADN, 3 nM d'amorce sens et 3 nM d'amorce anti-sens (respectivement T7 ; TAATACGACTCACTATAG et T3 ; GGGAAATCACTCCCAATTAA) ajoutés à un mélange préparé à partir du kit contenant le tampon, l'enzyme les dNTP et les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP s'incorporent de la même façon que les dNTPs lors de

l'étape de polymérisation mais bloquent l'élongation de la chaîne. Chacun des quatre ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est complexé à un fluorophore différent et permet de détecter les fragments d'ADN synthétisés. Après la PCR, les produits sont purifiés par précipitation à l'isopropanol puis dissous dans la formamide. Une électrophorèse sur capillaire des produits de PCR est réalisée et analysée sur séquenceur capillaire 3130 (Applied Biosystems).

### **3. Clonage de la séquence d'intérêt dans le plasmide pH1**

Le but est d'associer la séquence d'intérêt à un promoteur. Nous avons utilisé le promoteur humain H1 qui permet la fixation de l'ARN polymérase III, responsable de la synthèse d'ARN courts comme les ARNt, les ARNs (small ARN) et les ARN ribosomiques (ARNr 5S). La séquence est donc excisée du plasmide pGEM-T par coupure enzymatique avec BamHI et HindIII. Dans le même temps, le plasmide pH1 (Anne Galy, Généthon, Evry) est également clivé par les enzymes BglII (site de coupure compatible avec celui de BamHI) et HindIII.

#### *a) Première digestion par les enzymes de restriction*

Une première coupure est effectuée en parallèle sur les deux plasmides. Pour pGEM-T : 10 ng de plasmide sont mélangés avec l'enzyme BamHI (3 µL), le tampon de l'enzyme, et complété avec de l'eau pour un volume final de 50 µL. Pour pH1 : 1 µg de plasmide est mélangé avec l'enzyme BglII (3 µL), le tampon de l'enzyme, et complété avec de l'eau pour un volume final de 50 µL. La réaction se fait à 37°C pendant 2 h.

#### *b) Purification des séquences*

Après le premier clivage enzymatique, les deux produits sont purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour séparer les fragments digérés de ceux non digérés. La zone du gel contenant le fragment d'intérêt est découpée. Les étapes suivantes se réalisent avec le kit Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel) afin d'éliminer l'agarose, les sels et autres contaminants contenus dans la solution, suivant le protocole du fabricant. Le gel est dissout dans le tampon NT (200 µL par 100 mg d'agarose) à 50°C puis la solution est chargée sur des colonnes qu'on centrifuge 1 min à 11000 x g. La colonne est lavée avec le tampon NT3 puis séchée par centrifugation (2 min à 11000 x g). L'ADN est élué avec 50 µL d'eau sans DNase et RNase.

#### *c) Deuxième digestion par les enzymes de restriction*

La deuxième coupure enzymatique est effectuée de la même façon que la première mais avec l'enzyme HindIII. Le marqueur de taille Smart Ladder (MW-1700-10, Eurogentec, Belgique) permet

une estimation approximative de la quantité d'insert et de vecteur après dépôt sur gel d'agarose 1,5%.

#### *d) Intégration de la séquence codant pour le shRNA dans le plasmide pH1*

Les étapes suivantes sont les mêmes que précédemment : ligation entre la séquence d'intérêt et le plasmide pH1 avec un rapport de 3:1 respectivement, suivi d'une transformation bactérienne et d'une PCR sur colonie. Des minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées pour effectuer ensuite un séquençage. Un seul clone est conservé pour effectuer les étapes suivantes.

#### **4. Clonage de la séquence H1-shRNA dans le plasmide pLenti-GS-RNAi**

Le but est d'introduire la séquence shRNA avec son promoteur H1 dans un plasmide contenant le gène de la protéine fluorescente verte (GFP) qui est sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus), ainsi que les séquences régulatrices 3' et 5' LTR (Long Terminal Repeat). Ces deux séquences sont indispensables pour l'expression des gènes viraux mais également pour l'intégration du génome viral, ici notre séquence d'intérêt, dans le génome de la cellule hôte.

De la même façon, la séquence d'intérêt précédée de son promoteur H1 est excisée du plasmide recombinant pH1 avec les enzymes de restrictions ClaI et SpeI. Ces mêmes enzymes servent également à cliver le plasmide pLenti-GS-RNAi (conçu par l'équipe de Zufferey et al., 1999). Les fragments d'intérêts (insert et vecteur) sont ensuite purifiés et quantifiés sur gel d'agarose. Après ligation, une étape de transformation bactérienne suivie d'une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée afin d'effectuer un dernier séquençage. Si ce séquençage est correct, on réalise une maxipréparation d'ADN plasmidique (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi ; Macherey Nagel) basée sur le même principe que la minipréparation. Une partie de la suspension bactérienne issue de la maxipréparation est conservée avec du glycérol (v/v) à -80°C.

#### **5. Production de particules virales à l'aide de cellules HEK-293-FT**

Le mode d'assemblage des lentivirus est intra-cytoplasmique. Il est nécessaire, pour produire des particules virales, de transfecter des cellules avec différents plasmides codant chacun pour des protéines virales (protéines d'enveloppe, protéines accessoires). Après l'assemblage et l'encapsidation des particules virales, les virions sont libérés hors de la cellule hôte par exocytose.

La veille des transfections, les cellules HEK-293-FT (Invitrogen) sontensemencées à raison de 4.106 cellules dans une boîte de diamètre 100 mm contenant un milieu complet (6 boîtes par production).

On prépare une première solution contenant trois plasmides : 1,5 µg de pLenti-GS-RNAi contenant le shRNA, 1 µg de plasmide pCMVG codant pour les protéines d'enveloppe et 1 µg de plasmide p8.74 codant pour les protéines accessoires et complétée avec de l'eau (qsp 15 µL). Une deuxième solution contenant 9% de Fugene 6 (Roche) qui est l'agent de transfection, dilué dans le milieu Opti-Mem (Invitrogen). Les deux solutions sont mélangées et incubées 15 min à température ambiante pour que le complexe plasmide-Fugene se forme. La solution est répartie goutte à goutte dans le nouveau milieu de culture des cellules HEK-293-FT. Les virus sont récoltés à trois reprises dans le surnageant, deux fois deux jours après la transfection (le matin puis en fin d'après-midi) et la troisième fois trois jours après. Les surnageants de culture filtrés (sur membrane de pores de 0,45 µm de diamètre) sont ensuite ultracentrifugés sur coussin de saccharose 20 % (150000 x g) pendant 90 min à 4°C. Le culot de virus est remis en suspension dans du PBS (150 µL), aliquoté et conservé à -80°C, sans connaître le titre de particules virales. Ce titre sera déterminé ultérieurement (voir page suivante).

#### *D. Transduction*

La transduction est un processus de transfert de gène, tout comme la transfection, qui permet l'introduction d'une séquence nucléotidique exogène dans le génome de cellules eucaryotes, à la différence qu'elle est médiée par un virus, ici un lentivirus. Dans cette étude, des shRNA ont été construits (décrit précédemment) afin d'inhiber spécifiquement et de façon stable l'expression de la sous unité  $\alpha$  de la protéine  $Na_v1.5$  et la sous-unité  $\beta 4$ .

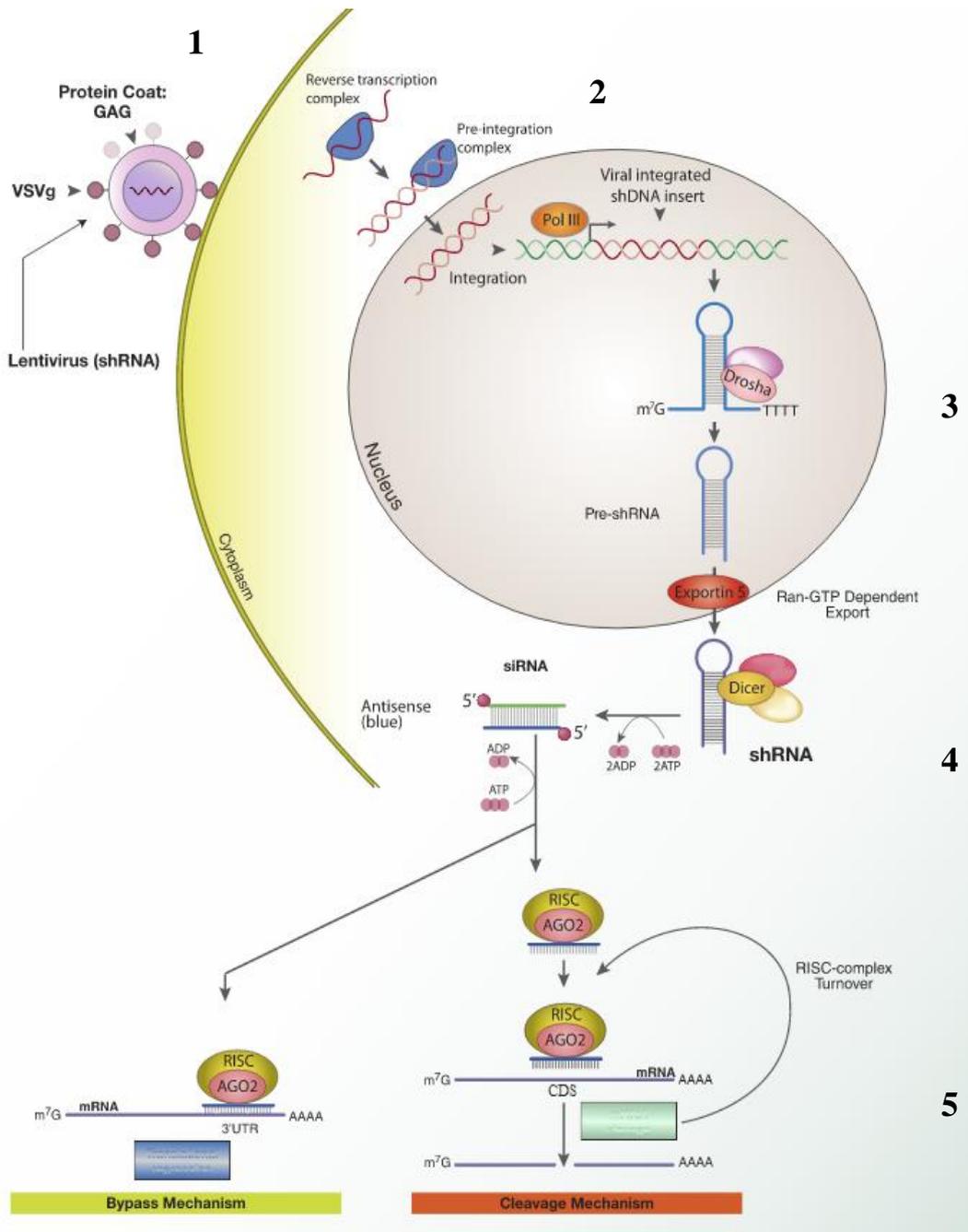
Le polybrène, un agent de transduction, est un polycation qui neutralise les interactions de charge et permet d'augmenter la probabilité de liaison entre la capsidie pseudovirale et la membrane cellulaire. Après fusion et décapsidation, une étape de transcription inverse est indispensable avant l'import nucléaire et l'intégration génomique de la séquence codante pour les shRNA. Après transcription par la polymérase III, le produit est pris en charge par une RNase, Drosha, permettant la formation d'un pré-shRNA. Cette séquence est ensuite exportée vers le cytoplasme via une exportine (exportine 5) puis complexée à DICER, entraînant ainsi la même cascade décrite précédemment (B, p.70), lors de l'utilisation de siRNA (figure 18).

Les cellules MDA-MB-231 Luc sontensemencées la veille sur une plaque de 6 puits à  $3 \times 10^5$  cellules par puits. Afin de connaître le titre viral, les cellules ont tout d'abord été transduites avec une solution contenant différents volumes de production virale (1, 5, 10 ou 20 µl de virus ; Vv), 5 µg/mL de Polybrène (Sigma) et du DMEM complété en sérum (5%). Les deux puits restant sont utilisés : l'un

servira de contrôle (les cellules non transduites) et l'autre sert à compter le nombre de cellules contenues dans un puits au moment de la transduction ( $N_t$ ). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP (% GFP) est déterminé par cytométrie en flux 72 h après la transduction. On peut alors déterminer la concentration en particules virales par les formules suivantes :

$$\frac{N_t \times \% \text{ GFP}}{100} = A \quad \text{et} \quad \frac{A}{V_v} = \text{TU} / \text{mL}$$

A est le nombre de cellules transduites et la concentration en particules virales est exprimée en unité de transduction (TU) par millilitre.



**Figure 20:** Transduction par un vecteur lentiviral et mécanisme d'interférence par ARN dans une cellule animale.

C'est un processus complexe décrit en 5 étapes clés : 1/ La fusion de la particule virale avec la membrane plasmique de la cellule permettant la libération des séquences d'intérêt. 2/ Après une étape de transcription inverse, les séquences vont s'intégrer au génome de la cellule. 3/ Une fois transcrite, la séquence ARN est exportée vers le cytoplasme où 4/ elle est prise en charge par différents complexes, conduisant à 5/ la dégradation des ARNm ou à l'inhibition de la traduction des protéines. (d'après Dan Coyocari, Department of Medical Biophysics, University of Toronto 2010; [http://en.wikipedia.org/wiki/RNA\\_interference](http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference)).

## *E. Etude de l'expression des protéines par western blotting*

Le western blotting est une technique qui permet l'identification des protéines dans un échantillon. Elle est essentiellement basée sur la reconnaissance spécifique d'un antigène par un anticorps. Les protéines sont purifiées à partir d'un lysat cellulaire, dénaturées puis séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) ou de nitrocellulose. Enfin la détection se fait grâce à un anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire qui se fixe à la protéine d'intérêt, qui est couplé à une enzyme HRP (horseradish peroxydase).

### **1. Préparation des échantillons**

Les protéines sont purifiées à partir d'un culot cellulaire préalablement rincé 2 fois avec du PBS afin d'éliminer toute trace de protéines contenues dans le milieu de culture. Le culot est lysé par 100  $\mu\text{L}$  de tampon (contenant 1 % (v/v) triton X-100, 20 mM tris, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM EDTA, pH=7,4) auquel est ajouté extemporanément un cocktail d'inhibiteurs de protéases (10% (v/v) et une solution 10 fois concentrée ; réf P2714, Sigma-Aldrich). Le mélange est agité doucement 10 min à température ambiante puis 1 h à 4°C. Les échantillons sont centrifugés à 5000 x g pendant 5 min dans le but de retirer les débris cellulaires et seul le surnageant de protéines solubles est récupéré. Pour pouvoir comparer l'expression des protéines d'intérêt dans différentes conditions, il est nécessaire de déposer la même quantité de protéines. Pour cela, on procède à un dosage des protéines par réaction colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA, kit BCA, Thermo Scientific). Les protéines contenues dans les échantillons vont réduire les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  en ions cuivreux  $\text{Cu}^{1+}$ . L'acide bicinchoninique ayant une forte affinité pour  $\text{Cu}^{1+}$ , la chélation de 2 molécules de BCA avec un ion cuivreux va former un composé de couleur pourpre ayant une absorbance optique maximale à 562 nm. En pratique, 25  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont déposés dans une plaque 96 puits auxquels 200  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel BCA sont ajoutés. En parallèle, une gamme étalon est réalisée avec l'albumine de sérum bovin (BSA, Bovine Serum Albumine). La plaque est ensuite incubée à 30 min à 37°C puis lue au spectrophotomètre. Enfin, la concentration protéique des échantillons est déterminée grâce à l'équation de la droite établie à partir d'une gamme étalon.

### **2. Electrophorèse sur gel**

Les différentes protéines contenues dans un échantillon sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (6, 8, 10 ou 12 % suivant la taille des protéines étudiées). Les échantillons protéiques sont incubés en présence d'un

agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoéthanol, et d'un agent dénaturant qui est un détergent anionique fort, le sodium dodécyl sulfate (SDS). En fonction des protéines d'intérêt, les échantillons sont dénaturés pendant 45 min à température ambiante ou 3 min à 95°C. Les gels de polyacrylamide sont placés dans une cuve contenant du tampon d'électrophorèse conducteur (25 mM Tris, 190 mM Glycine et 0,1 % de SDS et le pH est ajusté à 8,3). Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad) sont déposés dans les puits du gel puis la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique. Le générateur est réglé pour délivrer un ampérage constant de 50 mA par gel et la séparation dure environ 2h.

### **3. Transfert sur membrane**

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par un anticorps, elles sont transférées depuis le gel vers une membrane de PVDF (Immobilon P transfert membrane, de porosité 0,2  $\mu$ m, Millipore) préalablement activée dans du méthanol. Pour que les bandes sur la membrane soit identiques à celle du gel, on procède à un montage "en sandwich" dans lequel il faut s'assurer que le contact entre la membrane et le gel soit parfait sans bulle d'air. Le montage est ensuite placé dans un module Mini Trans-Blot Cell (BioRad) rempli de tampon de transfert (25 mM Tris, 190 mM Glycine, 20 % de méthanol et le pH est ajusté à 8,3). Le transfert est réalisé à un ampérage constant de 350 mA pendant 90 min.

### **4. Détection par anticorps**

Les membranes sont incubées deux heures à température ambiante dans une solution de Tris-Buffered Saline contenant 0,1% (v/v) de Tween 20 (TBS-T 0,1%) et 5% de lait écrémé. Les protéines de lait permettent de saturer les sites de la membrane n'ayant pas fixé de protéines, pour empêcher la fixation non spécifique de l'anticorps primaire. Les membranes sont ensuite incubées avec une solution de TBS-T 0,1%, 5% de lait écrémé et les anticorps primaires (tableau 4) pendant une nuit, sous agitation, à 4°C. Les membranes sont ensuite rincées et débarrassées de toute trace d'anticorps primaire par 5 lavages de 5 min avec du TBS-T 0,1% avant d'être incubées pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (tableau 5). Cet anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire, est couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP). Les membranes sont de nouveau rincées 5 fois 5 min. La révélation se fait à l'aide d'un kit ECL (enhanced chemiluminescence ; réf 32106 ThermoScientific) contenant du luminol. L'HRP va catalyser la réaction d'oxydation du luminol, en condition alcaline et en présence de peroxyde d'hydrogène. Cette réaction induit une émission de photons. Les membranes sont alors incubées dans une solution composée des

2 réactifs du kit ECL pendant 1 min. Les membranes sont ensuite placées sous une caméra (DNR Bio Imaging Systems ; MF ChemiBIS 3.2 ; SciencesTech) et analysées à l'aide du logiciel Multi Gauge.

**Tableau 4 :** Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blotting

PROTEINE RECHERCHEE	ANTICORPS	REFERENCE	FOURNISSEUR	DILUTION	ESPECE	MASSE MOLECULAIRE DE LA PROTEINE
<b>NHE-1</b>	IgG1 monoclonales anti-NHE-1 clone 4E9	MAB3140	Chemicon International, Millipore France	1/1000	souris	90-110 kDa
<b>Canaux sodiques Na<sub>v</sub> toutes isoformes</b>	IgG1 monoclonales anti-sodium channel (pan) clone K58/35	S8809	Sigma, France	1/200	souris	250 kDa
<b>Na<sub>v</sub>1.5</b>	IgG anti-Na <sub>v</sub> 1.5	S0819 lot 061M1688	Sigma, France	1/1000	lapin	250 kDa
<b>β-Actine</b>	IgG1 monoclonales anti-β-actine HRP	(C4) sc-47778	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	souris	43 kDa
<b>HSC70</b>	IgG2a monoclonales anti-HSC70	(B-6) sc-7298	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/30000	souris	70 kDa
<b>Cortactine</b>	IgG1 monoclonales anti-cortactine (p80/85) clone 4F11	05-180	Millipore, France	1/1000	souris	80 kDa
<b>β4</b>	IgG anti-SCN4B	HPA017293	Sigma, France	1/400	lapin	30 kDa
<b>β2</b>	IgG anti-SCN2B	HPA012585	Sigma, France	1/200	lapin	33 kDa
<b>β1</b>	IgG anti-SCN1B	AV35028	Sigma, France	1/1000	lapin	35 kDa
<b>MT1-MMP</b>	IgG anti-MT1-MMP	AB6004	Millipore, France	1/1000	lapin	65 kDa
<b>FAK</b>	IgG anti-FAK	(C20) sc-558	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	lapin	125 kDa
<b>β-adaptine</b>	IgG1 monoclonales anti-β-adaptine	BD610382	BD Biosciences, France	1/2500	souris	109 kDa
<b>cavéoline-1</b>	IgG monoclonales anti-cavéoline-1	3267	Cell signaling, Ozyme France	1/2000	lapin	22 kDa
<b>Luciférase</b>	IgG1 monoclonales anti-luciférase ( <i>Photinus pyralis</i> ) clone CS 17	35-6700	Invitrogen, France	1/1000	Souris	62 kDa

**Tableau 5 :** Liste des anticorps secondaires utilisés pour le western blotting

PROTEINE RECHERCHEE	ANTICORPS	REFERENCE	FOURNISSEUR	DILUTION	ESPECE
<b>IgG de lapin</b>	anti-lapin IgG-HRP	W401	Promega, France	1/3000	chèvre
<b>IgG de souris</b>	anti-souris IgG-HRP	sc-2005	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/3000	chèvre

# III. Patch clamp : Etudes de l'activité des canaux ioniques

---

## A. *Principe de la technique de patch clamp*

La technique du patch clamp a été mise au point dans les années 1970 par E. Neher et B. Sakmann et leur a valu le prix Nobel de physiologie et médecine en 1991. Elle permet l'étude des caractéristiques électriques de cellules excitables ou non. Plus précisément, le patch clamp permet l'étude des courants ioniques lors du passage d'ions à travers la membrane plasmique via des canaux ioniques membranaires ou autre protéine électrogène. Il existe deux types de mesures en patch clamp : mesure en courant imposé (current clamp) qui permet l'étude de la variation de potentiel membranaire ou mesure en potentiel imposé (voltage clamp) qui permet l'étude des courants ioniques en réponse à travers la membrane plasmique.

Le principe de la technique est de mettre une micropipette en verre contenant une solution ionique connue (milieu intrapipette ou MIP) en contact avec une cellule vivante isolée. La zone membranaire présente sous l'orifice de la pipette est nommée "patch". Le contact (scellement) entre la pipette et la cellule va alors créer une résistance importante appelée "seal" et qui doit être supérieure à 1 Giga Ohm ( $G\Omega$ ) ; on parle alors de "gigaseal". A ce stade, il existe plusieurs configurations possibles de la technique de patch clamp permettant différentes mesures (Hamill et al., 1981) : soit la mesure de courants globaux, soit la mesure de courants unitaires. Une première configuration est obtenue après le gigaseal. Nommée "cell-attached" ou cellule attachée, elle permet d'enregistrer des courants dus à l'activité des canaux ioniques situés juste dans la zone de patch. A partir de cette configuration, une dépression dans la micropipette va rompre la membrane présente sous la microélectrode, permettant ainsi un accès à la cellule entière. Cette configuration "whole-cell" ou cellule entière permet un contrôle total du milieu intracellulaire dialysé par le MIP. Utilisée pour l'ensemble de nos études, elle permet d'enregistrer les courants globaux générés sur l'ensemble de la membrane cellulaire. Il existe deux autres configurations dites de patch excisé nommée "Inside-Out" et "Outside-out", où le morceau de membrane est arraché de la cellule et reste collé à la pipette. Ces dernières configurations permettent d'enregistrer des courants unitaires du ou des canaux isolés sous la pipette. Ces configurations sont souvent utilisées pour l'étude des canaux activés par la fixation d'un ligand intracellulaire ou extracellulaire.

## B. Méthode

### 1. Installation du poste de patch clamp

L'équipement expérimental est placé sur une table anti-vibration (Ealing, USA) et est isolé électriquement par une cage de Faraday reliée à la terre. Une boîte de Pétri contenant les cellules est placée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon Eclipse Ti, Nikon, France). Ce microscope est également équipé d'une lampe d'excitation et de cube à fluorescence (contient un filtre d'excitation, un miroir dichroïque et un filtre d'émission spécifique), permettant la sélection de cellules fluorescentes. Un système de changement rapide de solutions (RSC-160, BioLogic, Science Instrument) permet le contrôle de 9 réservoirs différents par des électrovannes. Chaque réservoir est relié à un capillaire en verre qui est placé à proximité de la cellule à l'aide d'un micromanipulateur et permet de maîtriser l'environnement péri-cellulaire. La pipette de patch, remplie de MIP, permet à la fois d'imposer le potentiel et de détecter les courants ioniques, c'est l'électrode de mesure. Elle est placée sur la tête de l'amplificateur de patch clamp (Axopatch 200-B, Axon Instruments, USA) au contact d'un filament d'argent chloruré et est approchée jusqu'à la cellule à l'aide d'un micromanipulateur piézoélectrique (MP-225, Sutter Instrument®, USA). La pipette assure ainsi la conversion du courant électrique d'origine ionique en flux d'électrons suivant la réaction :  $\text{Cl}^- + \text{Ag} \leftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$ . Le circuit électrique est fermé par la présence d'une électrode de référence en argent chloruré qui baigne dans la solution saline extracellulaire. L'amplificateur est relié à un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1440A, Axon Instruments, USA). Après avoir été converti en tension et amplifié, le signal est transformé pour être ensuite analysé par ordinateur. Les courants sont filtrés à une fréquence de 2 kHz par un filtre analogique et sont échantillonnés à une fréquence de 10 à 50 kHz, suivant les protocoles utilisés. Les courants sont analysés par le logiciel pClamp 10.4 (Axon Instruments, USA). Les différents protocoles imposés sont également gérés par ce même logiciel. Les graphiques et courbes sont réalisés grâce au logiciel OriginPro 8.5 (Microcal Software, USA).

### 2. Matériels et solutions utilisés

Les pipettes sont réalisées à l'aide d'une étireuse verticale (PP-830, Narishige, Japon), à partir d'un capillaire de verre à hématocrite (160214, Vitrex), étiré en deux temps par deux chauffages successifs. Ce type de pipette présente l'avantage d'obtenir un scellement à la membrane très rapide et de très bonne qualité. Cependant, sa capacité électrique est très élevée et n'est pas complètement compensable par les fonctions de l'amplificateur, ce qui peut altérer l'enregistrement de certains courants rapides. Le diamètre de la pipette peut être contrôlé par la mesure de sa résistance qui doit

être comprise entre 3 et 6 MΩ. Les pipettes sont remplies d'un milieu mimant le milieu intracellulaire et appelé MIP (milieu intrapipette, voir composition en Tableau 6).

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre au moins 24h avant l'expérience et raison de 30 000 cellules par boîte. Le milieu de culture contenant des protéines et facteurs de croissances peut empêcher l'établissement du "seal". Il est donc rincé et remplacé par une solution physiologique saline (PSS) de composition proche du milieu extracellulaire (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Composition de la solution physiologique saline (PSS) et du milieu intrapipette (MIP). Le pH du PSS est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH et celui du MIP à 7,2 à l'aide de KOH.

COMPOSITION EN mM	PSS	MIP
NaCl	140	15
KCl	4	130
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33	-
CaCl <sub>2</sub>	2	0,37*
MgCl <sub>2</sub>	1	1
Mg-ATP	-	1
HEPES	10	10
EGTA	-	1*
D-glucose	11,1	-

\* En présence de 1mM d'EGTA, la concentration de Ca<sup>2+</sup> libre dans le MIP est de 100 nM (pCa7)

### 3. Protocoles expérimentaux

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé différents protocoles électrophysiologiques, principalement pour l'étude des courants sodiques dépendant du voltage.

Les canaux Na<sub>v</sub> ont plusieurs caractéristiques : ils sont perméables aux ions sodium (Na<sup>+</sup>) de façon très sélective ; leur activation est dépendante de la dépolarisation membranaire et ils ont des

cinétiques d'activation et d'inactivation très rapides. Ces différents points impliquent des protocoles expérimentaux courts (inférieurs à 100 ms) avec une fréquence d'échantillonnage élevée et un potentiel de maintien ("holding") hyperpolarisé (-100 mV dans notre cas) pour avoir une disponibilité maximale des canaux  $I_{NaV}$  (en effet, à un potentiel très hyperpolarisé, l'ensemble des canaux  $I_{NaV}$  de la cellule sont dans un état fermé pouvant être activé).

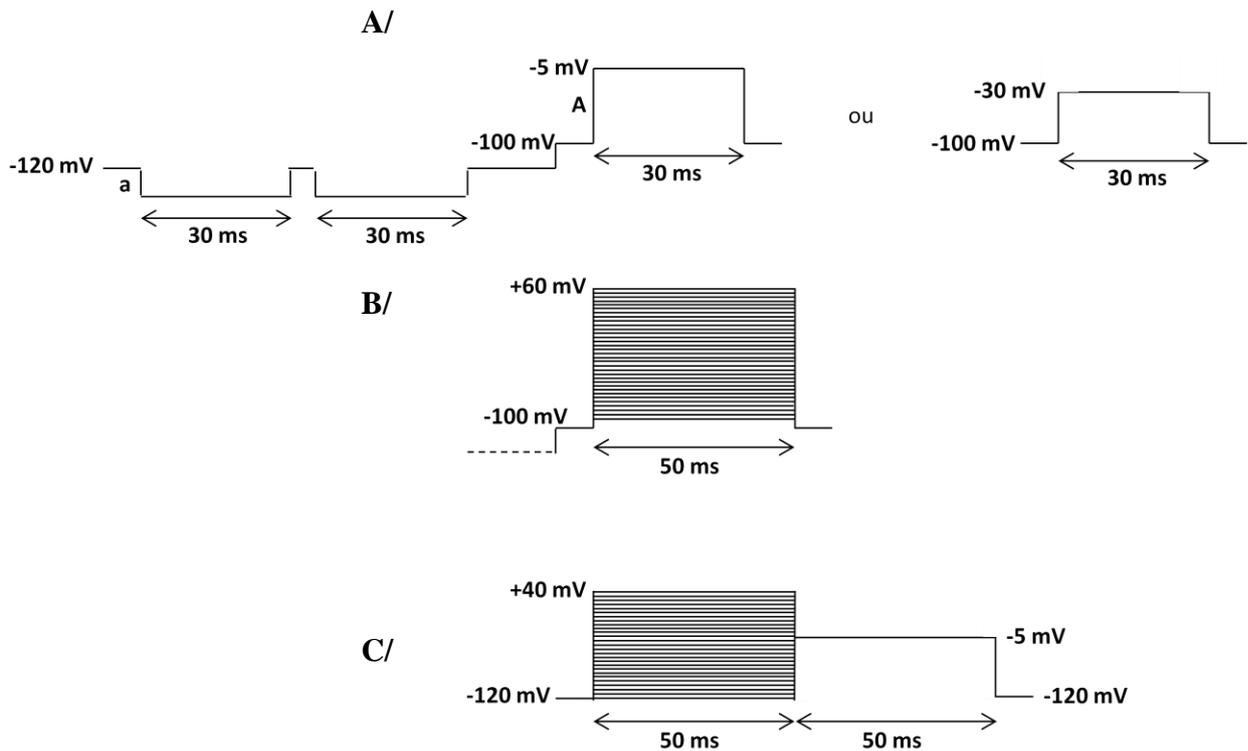
Le premier protocole utilisé est celui du courant sodique ( $I_{Na}$ ) en fonction du voltage ( $I_{Na}$ -V) et pour cela nous avons réalisé des dépolarisations successives par créneaux de -100 à +60 mV, incréments de 5 mV et à une fréquence de 2 Hz (figure 21). Le créneau de dépolarisation dure 30 ms. Ce protocole permet d'observer le seuil d'activation et l'amplitude maximale d' $I_{Na}$  en fonction du voltage imposé ainsi qu'éventuellement le potentiel d'inversion. Une courbe d'activation en fonction du voltage imposé peut être construite en reportant l'amplitude d' $I_{Na}$  relative à l'amplitude maximale en fonction du voltage imposé.

Afin de tester l'effet de différentes molécules sur  $I_{Na}$ , nous avons appliqué des créneaux de dépolarisations de -100 à -5 mV (figure 21), voltage pour lequel l'amplitude maximale du courant est enregistrée, se succédant à une fréquence de 2 Hz. Ce protocole permet d'analyser l'amplitude maximale du courant enregistré en fonction du temps et il est également utilisé pour les études de cinétiques ( $\tau$ ) d'activation (équation de Boltzman ci-après) et d'inactivation (équation d'une exponentielle croissante de type  $Y=1 \times \exp(x/t1) + y0$ ). Sur ce même modèle, nous avons utilisé des dépolarisations de -100 à -30 mV (figure 21). Ce protocole nous permet d'observer les caractéristiques du courant sodique à un potentiel proche du potentiel membranaire des cellules MDA-MB-231 en culture (-36,8 mV  $\pm$  1,5 mV ; Gillet et al. 2009). Ce protocole de dépolarisation membranaire de -100 à -30 mV nous a également servi dans l'étude du courant sodique persistant. La moyenne du courant obtenu au cours des 10 dernières millisecondes (entre 40 et 50 ms) a été calculée et comparée entre les différentes conditions expérimentales.

Pour évaluer la disponibilité des canaux  $I_{NaV}$  en fonction du voltage, nous avons utilisé un protocole au cours duquel on applique une dépolarisation à -5 mV pendant 50 ms (pulse test) immédiatement après le protocole d' $I_{Na}$ -V (pré-pulse). Plus le potentiel est dépolarisé lors du premier créneau, plus la proportion de canaux sodiques inactivés est grande dans la cellule, par conséquent moins il reste de canaux  $I_{NaV}$  disponibles pour le deuxième créneau. La courbe de disponibilité peut alors être construite en reportant l'amplitude d' $I_{Na}$  relative à l'amplitude maximale lors du deuxième créneau, en fonction du voltage imposé au cours du premier protocole. Les courbes d'activation et de disponibilité sont lissées par une fonction de Boltzmann du type :

$$Y=1/(1+\exp(V\frac{1}{2}-V)k)$$

Avec Y, le paramètre d'intérêt (conductance ou disponibilité),  $V\frac{1}{2}$  le voltage auquel la demi-conductance ou demi-inactivation se produit, k est le facteur de pente qui détermine les changements de conductance ou d'inactivation en fonction du voltage V.



**Figure 21** : Schéma des différents protocoles utilisés.

A/ Protocole de dépolarisation à -5 mV ou -30 mV. B/ Protocole du courant  $I_{Na}$  en fonction du voltage ( $I_{Na}-V$ ). C/ Protocole de disponibilité. Le protocole de P/n est appliqué pour les protocoles de dépolarisation à -5 mV et -30 mV ainsi que pour le protocole d' $I_{Na}-V$ . "a" est l'amplitude du créneau appliqué et "A" l'amplitude du créneau test.

Lors de ces protocoles expérimentaux deux types d'artefacts peuvent affecter les signaux enregistrés : les courants capacitifs de pipette et les composantes de fuite non spécifiques. Ces paramètres sont compensés en partie par une fonction de l'amplificateur ainsi que par l'établissement d'un protocole P/n de soustraction des composantes linéaires. Ce protocole de n créneaux (ici n = 2) précède les protocoles expérimentaux. La succession de créneaux est appliquée à partir du potentiel de -120 mV pour lequel aucun canal n'est activé et seules les composantes linéaires sont enregistrées. L'amplitude (a) de ce créneau est égale à  $A/n$  créneau (ici  $a = A/2$ ) de

l'amplitude (A) du créneau test et de polarité opposé (figure 20 A). Tous les courants sont enfin analysés et exprimés en densité de courant (pA / pF) afin de les normaliser à la taille de la cellule.

# IV. Mesure du pH intracellulaire par spectrofluorimétrie

---

## A. Principe

Le pH intracellulaire (pHi) est mesuré à l'aide d'une sonde fluorescente, la 2',7'-bis (carboxyéthyl)-5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF) (Réf. B1170 Thermo Fischer Scientific, France). Sa forme liposoluble acétoxyméthyle ester " BCECF-AM" est capable de traverser la membrane plasmique et permet son intégration dans les cellules. Après hydrolyse par les estérases cytoplasmiques, le BCECF libéré redevient alors une molécule polyanionique et hydrophile ce qui empêche la molécule de quitter la cellule. Le BCECF présente un pic d'émission à 530 nm et deux longueurs d'ondes d'excitation : l'une à 444 nm, point isobestique indépendant du pHi, et l'autre à 503 nm dépendante du pHi. La fluorescence émise à 530 nm lorsque l'on excite à 503 nm est donc proportionnelle au pHi. Ces mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F-2500 (Hitachi, Japon). Afin de s'affranchir de toute variation de fluorescence indépendante du pHi mais due à la concentration cellulaire ou à la variation de la concentration intracellulaire de la sonde par exemple, le rapport des intensités de fluorescence,  $R = F_{503}/F_{444}$ , est calculé.

Cette technique a été élaborée pour la mesure du pH intracellulaire d'une population de cellules en suspension et est un outil pour évaluer l'activité de l'échangeur NHE-1 dans nos cellules.

## B. Méthode

### 1. Isolement des cellules

Les cellules,ensemencées 72h avant l'expérience à une densité de 30 000 cellules par cm<sup>2</sup> en flacon de 75 cm<sup>2</sup>, sont lavées de leur milieu de culture par deux rinçages avec une solution de Hanks (Réf. H1387, Sigma, France ; Tableau 7). Afin de les décoller de leur support, elles sont ensuite incubées 5 min à température ambiante et sous agitation circulaire avec une solution de Hanks sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> et complétementée avec 2 mM d'EDTA, puis grattées doucement avec un râteau en plastique. La suspension cellulaire recueillie est centrifugée 5 min à 1 000 x g. Le culot est ensuite rincé avec 30 mL de Hanks et centrifugé une seconde fois. Les cellules sont enfin remises en suspension dans 10 mL de Hanks contenant 2 µM de BCECF-AM et incubées 30 min à 37°C. Le BCECF-AM est, au préalable,

solubilisé avec du DMSO à la concentration de 1 mM. Après l'incubation, l'excès de fluorophore est retiré par un lavage des cellules dans du Hanks et une centrifugation de 5 minutes à 1000 x g. Le culot est repris avec 4,5 mL de Hanks. A partir de cette suspension cellulaire, deux fois 1 mL ont servi aux mesures de pouvoir tampon ( $\beta_i$ ) et de pHi initial. Les 2 mL de suspension cellulaire restant ont servi à réaliser deux mesures (deux fois 1 mL) d'efflux de protons ( $H^+$ ) dans des cellules préalablement acidifiées.

A la fin de chaque cinétique, une calibration est effectuée permettant de convertir les valeurs de fluorescence obtenues ( $R=F503/F444$ ) en valeur de pH. Pour cela, les pH intracellulaire et extracellulaire sont équilibrés à l'aide de la digitonine (un détergent qui perméabilise les membranes) (70  $\mu$ M). L'étalonnage s'effectue par trois à quatre ajouts d'acide chlorhydrique 0,1 N et la mesure simultanée du pH extracellulaire (électrode de pH placée directement dans la cuve) et de la fluorescence du BCECF. Ainsi, une droite d'étalonnage peut être construite en associant à chaque valeur de pH une valeur du rapport de fluorescence 503 nm / 444 nm.

**Tableau 7 :** Composition de la solution physiologique de Hanks. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH.

COMPOSITION EN mM	HANKS'
CaCl <sub>2</sub>	1,26
MgSO <sub>4</sub>	0,8
KCl	5,36
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44
NaCl	137
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,337
D-Glucose	5,55
HEPES	20
EDTA	-

## 2. Mesure du pouvoir tampon $\beta_i$

Le pouvoir tampon représente l'ensemble des mécanismes et propriétés cellulaires capables de compenser le pHi suite à une variation. Ces systèmes sont constitués de substances titrables, capables de consommer (bases) ou de donner (acides) des protons lorsque le pHi varie. Leur activité globale peut être évaluée par l'observation des variations de pHi suite à l'addition d'un acide ou d'une base faible. Le pouvoir tampon ( $\beta_i$ ) est exprimé en mM  $H^+$  / UpH.

Pour cela, 1 mL de Hanks est ajouté à 1 mL de suspension cellulaire chargée en BCECF et l'ensemble est centrifugé 3 min à 1000 x g. Le culot de cellules est repris avec 2 mL de Hanks et transféré dans une cuve en quartz placée dans le spectrofluorimètre Hitachi F-2500 équipé d'une lampe xénon et d'un monochromateur (Hitachi, Japon). Le début de la cinétique représente le pH intracellulaire à l'équilibre d'une population cellulaire. Cette mesure est importante puisqu'elle peut varier en fonction des différents traitements ou types cellulaires. Une base faible, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , est ajoutée à une concentration finale de 20 mM dans le milieu extracellulaire, ce qui conduit à une rapide alcalinisation suivie d'une acidification plus lente. En effet le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se dissocie en  $\text{NH}_4^+ + \text{Cl}^-$  puis en  $\text{NH}_3 + \text{H}^+$ . Le  $\text{NH}_3$  (non chargé) entre dans les cellules et fixe les protons intracellulaires, ce qui alcalinise le pH<sub>i</sub>. Nous pouvons alors calculer le pouvoir tampon  $\beta_i$  à l'aide de la formule suivante :  $\beta_i = \Delta[\text{NH}_4^+]_i / \Delta\text{pH}_i$

où :  $[\text{NH}_4^+]_i = [\text{NH}_3]_i \times 10^{\text{pKa} - \text{pH}_i}$

et  $[\text{NH}_3]_i = [\text{NH}_4^+]_e \times 10^{\text{pH}_e - \text{pKa}}$

$\text{pKa} (\text{NH}_4^+/\text{NH}_3) = 9.21$

i et e correspondent respectivement à intracellulaire et extracellulaire

### 3. Mesure d'efflux de protons sur cellules acidifiées

L'échangeur sodium-proton (NHE) est une protéine membranaire dont l'activité augmente lorsque le pH intracellulaire devient acide et permet une expulsion des protons alors en excès. Pour cette étude, il est donc nécessaire d'acidifier les cellules artificiellement en utilisant la technique du pré-pulse d'ammonium (Boron and De Weer, 1976). Les cellules sont incubées 3 min en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  puis centrifugées à 1 000 x g pendant 5 min et remises en suspension dans un milieu Hanks dépourvu de sodium (mais remplacé par de la N-Methyl-D-glucamine pour maintenir l'osmolarité) afin d'empêcher le fonctionnement de NHE. La suspension cellulaire est placée dans la cuve de mesure. Après ajout de sodium (130 mM de NaCl) NHE peut à nouveau jouer son rôle et faire sortir les protons en réponse à cette acidification intracellulaire. La vitesse d'alcalinisation dépendra de l'activité de l'échangeur :  $v_i$  (unité pH/min) =  $\Delta\text{pH}_i / \Delta t$ .

On calcule le flux net de proton,  $\text{JH}^+$  en  $\mu\text{M H}^+ / \text{seconde}$ , qui est égal au produit de l'activité de l'échangeur  $v_i$  et du pouvoir tampon  $\beta_i$ .

## V. Expérimentation animale

---

Afin d'étudier l'implication *in vivo* de la protéine Na<sub>v</sub>1.5 et de la sous-unité β4 dans le développement tumoral et métastatique (croissance et localisation des métastases), nous avons mis en place deux modèles animaux : un modèle de colonisation métastatique après injection de cellules tumorales dans la circulation ainsi qu'un modèle de xélogreffe orthotopique, tous les deux réalisés sur des souris immunodéprimées.

Les cellules injectées sont celles que nous avons modifiées génétiquement. Toutes les cellules expriment le gène de la luciférase. Certaines n'expriment plus la protéine Na<sub>v</sub>1.5 ou la sous-unité β4 ou encore surexpriment la sous-unité β4. Au cours des semaines, afin de suivre l'évolution de la bioluminescence des cellules injectées chez l'animal vivant anesthésié, une injection par voie intrapéritonéale de luciférine est effectuée sur les souris 5 min avant l'imagerie. La réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase des cellules, va émettre des photons qui seront détectés par l'imageur (Biospace).

L'ensemble des expérimentations a été réalisé par le Dr Séverine Marionneau-Lambot et M. Thibault Oullier sur la plateforme *in vivo* de "l'Axe valorisation des produits de la mer en cancérologie" du Cancéropôle Grand Ouest (Nantes).

### A. *Modèle de colonisation métastatique*

Ce modèle permet d'évaluer la capacité de cellules cancéreuses mammaires humaines, injectées dans la circulation veineuse, à coloniser des tissus et ainsi former des foyers cancéreux dans des sites préférentiels. Pour cette étude nous avons utilisé des souris femelles NMRI nude (Charles River, l'Arbresle, France) âgées de six semaines. Les cellules sont trypsinées le jour de l'injection. Elles sont mise en suspension dans du PBS (avec Ca<sup>2+</sup>) de façon à pouvoir injecter 2 millions de cellules dans un volume maximal de 150 μL. Ce volume est prélevé avec une seringue à insuline puis injecté dans la veine caudale (figure 22 A).

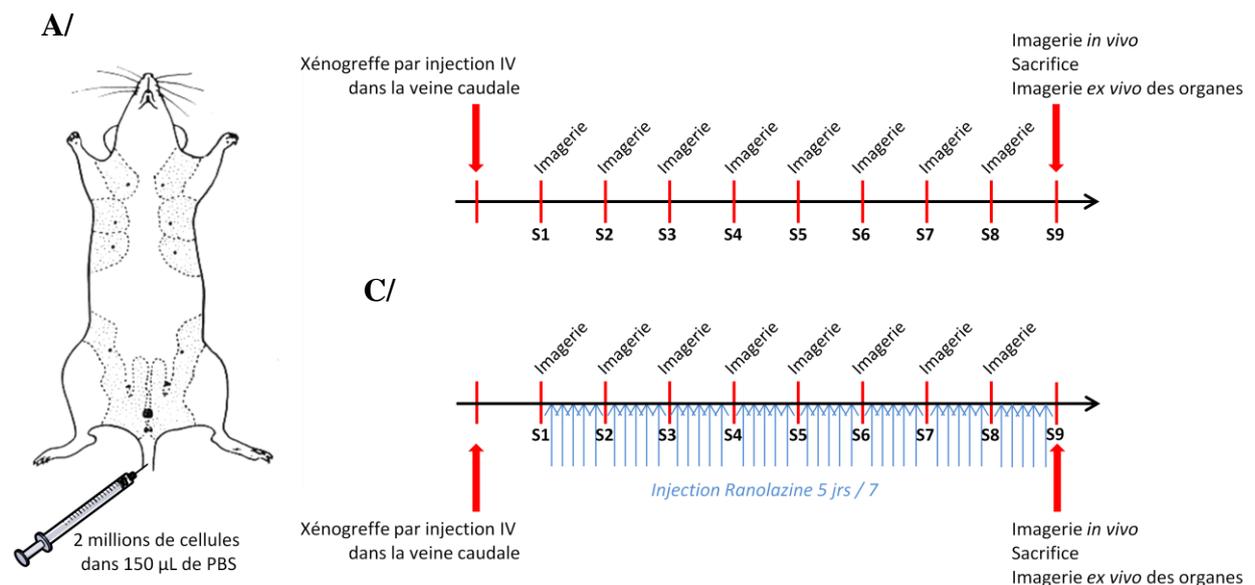
Les premières expérimentations sont réalisées avec quatre groupes de souris ayant reçue chacune une injection de l'une des quatre lignée cellulaires : MDA-MB-231-Luc-shRD, MDA-MB-231-Luc-shNa<sub>v</sub>1.5, MDA-MB-231-Luc-shβ4, MDA-MB-231-Luc-surexβ4.

Lors d'une deuxième expérimentation (figure 22 C), une semaine après la xénogreffe, les souris ont reçu cinq injections (injection par voie intra-péritonéale, IP) par semaine d'un agent pharmacologique : la ranolazine. Cette molécule est déjà utilisée en clinique depuis 2006 aux États-Unis, en Allemagne et au Japon (mais pas en France) pour ses propriétés anti-angoreuses et anti-arythmiques (elle inhibe le courant sodique persistant). Deux groupes sont alors établis :

- Le groupe "shRD CTL" : injection du solvant utilisé (PBS) pour la préparation de la molécule
- Le groupe "shRD Ranolazine" : injection de la molécule par voie intra-péritonéale à la dose de 50 mg/kg/jour

Lors de ces deux expérimentations, chaque semaine, de la semaine 2 à la semaine 9, un suivi de l'évolution tumorale par imagerie biphotonique a été réalisée (figure 22 B). Pour cela, on procède à une injection intra-péritonéale du substrat, la luciférine D (FP-MI224D, Interchim, France), à une dose de 150 mg/kg. Après 5 min, les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane puis examinées à l'imageur optique (Biospace). Cette étape permet le suivi non invasif de l'évolution des métastases *in vivo*. Un suivi pondéral est également réalisé avant chaque séance d'imagerie.

Après environ 9 semaines, les souris sont anesthésiées pour la dernière séance d'imagerie puis euthanasiées par dislocation cervicale. Après dissection, les organes principaux (poumons, foie, cerveau, os des pattes, colonne et côtes) sont passés à l'imageur (analyse *ex vivo*) pour détecter d'éventuelles métastases non détectables *in vivo*.



**Figure 22 :** Modèle de colonisation métastatique.

A/ Deux millions de cellules ont été injectées dans la veine caudale de souris immunodéprimées NMRI nude. Un suivi hebdomadaire de la bioluminescence des cellules *in vivo* a été réalisé pendant 9 semaines jusqu'au sacrifice de l'animal avec (C) ou sans (B) injection de ranolazine.

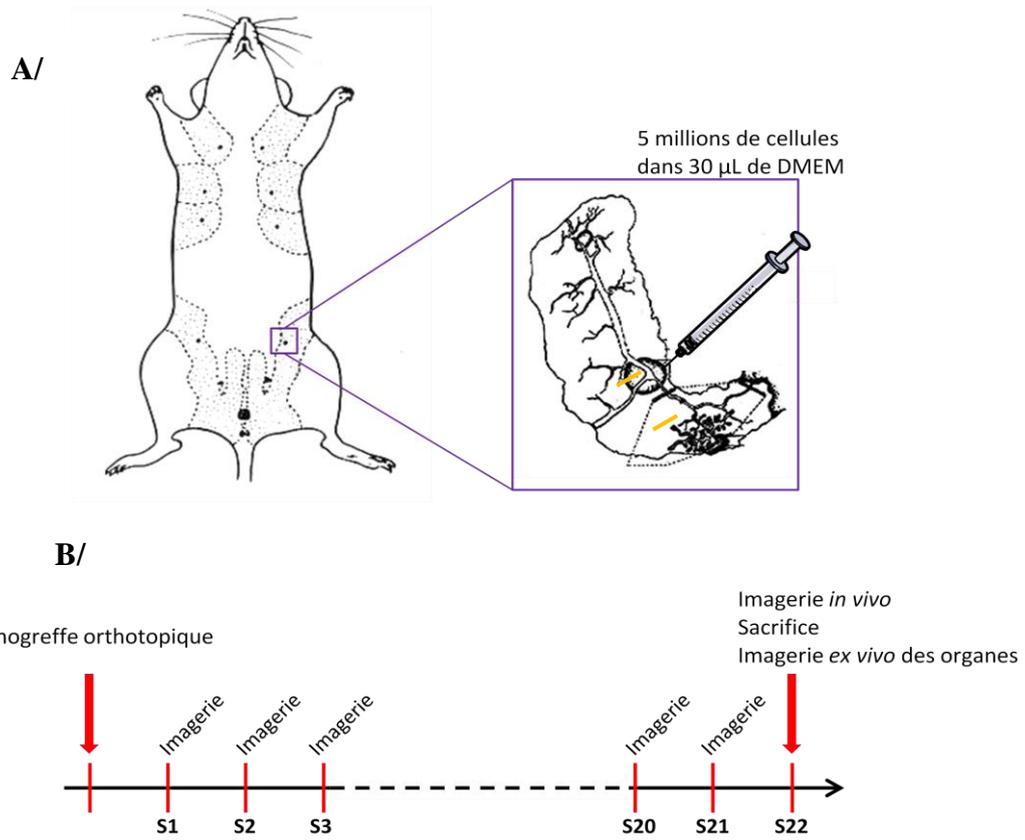
## *B. Modèle de xénogreffe orthotopique*

Ce modèle permet à la fois de suivre la croissance d'une tumeur primaire et le développement de métastases. Pour réaliser cette étude nous avons testé deux souches de souris : des souris femelles SCID beige (Charles River) et des souris femelles NMRI nude (Charles River, l'Arbresle, France) toutes âgées de quatre semaines. Les cellules MDA-MB-231-Luc shRD sont trypsinées le jour de l'injection. Une suspension cellulaire à 5 millions de cellules dans 30  $\mu$ L de milieu DMEM sans sérum est préparée. Une autre préparation a été testée en parallèle dans laquelle les cellules sont reprises et injectées avec du PuraMatrix™ (354250, Corning, France), hydrogel synthétique mimant un environnement tridimensionnel, a été testée en parallèle.

En préparation de la greffe, les souris reçoivent une injection d'analgésique (Rimadyl à 5 mg/kg) une heure avant l'intervention. Elles subissent ensuite une anesthésie chimique (cocktail de Xylazine/ Kétamine). L'intervention se déroule alors en plusieurs étapes :

1. Incision du plan cutané
2. Cautérisation de la liaison entre le 4ème et le 5ème bourgeon mammaire (ou fat pad) à l'aide d'un bistouri électrique
3. Injection de la suspension cellulaire dans le "cleared-fat-pad" (4ème bourgeon mammaire isolé du 5ème) (figure 22)
4. Suture

Les souris sont ensuite placées sous lampe chauffante pour le réveil. Une semaine post-greffe et durant 22 semaines, l'évolution tumorale et le développement des métastases sont suivis par imagerie de façon hebdomadaire (figure 23). Le protocole pour l'imagerie est le même que pour le modèle de colonisation métastatique. La mesure de la taille de la tumeur primaire avant la séance d'imagerie est réalisée à l'aide d'un pied à coulisse.



**Figure 23 :** Modèle de xéno greffe orthotopique.

A/ Injection de 5 millions de cellules dans le 4<sup>ème</sup> coussin graisseux dont le bourgeon mammaire a été détruit. Il y a au préalable cautérisation de part et d'autre du coussin graisseux (traits jaunes). B/ Suivi hebdomadaire de la bioluminescence *in vivo* pendant 22 semaines.

## VI. Statistiques

---

Pour l'ensemble des expérimentations, les résultats ont été traités à l'aide des logiciels Microsoft Excel et Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, USA). Les données sont représentées sous la forme de moyennes plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM) ou sous la forme de médianes. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel SigmaStat (Systat Software, San Jose, USA). Les tests utilisés sont adaptés aux échantillons (test de la somme des rangs ou test t de Student par exemple pour comparer 2 groupes ou ANOVA et le test des rangs de Wilcoxon pour comparer des échantillons appariés). Les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $P < 0,05$  et sont indiqués sous forme : \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  et \*\*\*  $P < 0,001$ , NS pour non statistiquement différent.

# Troisième partie :

## Résultats

# I. Le canal sodique $\text{Na}_v1.5$ stimule l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires en augmentant l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE-1 dans les invadopodes

---

## A. Introduction

L'activité des canaux sodiques dépendants du voltage régule l'invasivité des cellules cancéreuses et de nombreuses isoformes différentes se trouvent anormalement exprimées dans de nombreux types de cancers épithéliaux (Campbell et al., 2013; Diaz et al., 2007; Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003; Roger et al., 2007). Dans les biopsies cancéreuses mammaires ainsi que dans les cellules cancéreuses de la lignée MDA-MB-231, c'est l'isoforme  $\text{Na}_v1.5$  qui est exprimée et fonctionnelle (Fraser et al., 2005; Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003; Yang et al. 2012). L'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$  est responsable d'une entrée continue de sodium, via un "courant de fenêtre", au potentiel de membrane de ces cellules (Gillet et al., 2009). L'inhibition pharmacologique (TTX) ou moléculaire (siRNA) des canaux  $\text{Na}_v1.5$  n'a aucun effet sur la prolifération ou la migration des cellules MDA-MB-231 mais diminue d'environ 40 % leur invasivité *in vitro*, d'après un test de dégradation et d'invasion d'une matrice extracellulaire composée de Matrigel (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). Une diminution de la concentration extracellulaire de sodium diminue également l'invasivité cellulaire, et en particulier l'invasivité dépendante de  $\text{Na}_v$ . Inversement, une augmentation du courant de fenêtre par un activateur pharmacologique, la vératridine, augmente l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules MDA-MB-231 (Gillet et al., 2009). L'activité du canal, et par conséquent l'influx de sodium, semblent donc nécessaires au rôle de  $\text{Na}_v1.5$  dans l'invasivité cellulaire.

Un modèle *in vitro* de culture en trois dimensions dans du Matrigel a montré l'implication de l'activité du canal  $\text{Na}_v1.5$  dans la croissance de colonies de cellules MDA-MB-231 ainsi que leur échappement des colonies. En effet, l'application de TTX réduit la taille des colonies formées et également le nombre de cellules qui s'en échappent (Gillet et al., 2009). L'invasion d'une matrice par des cellules dépend de la capacité qu'ont les cellules à dégrader l'environnement extracellulaire et donc de leur activité protéolytique. Les cathepsines à cystéine sont des protéases extracellulaires qui présentent une activité protéolytique optimale à un pH acide. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques

des cathepsines B et S sur les cellules MDA-MB-231 entraîne une diminution significative de l'invasivité cellulaire et l'inhibition de  $\text{Na}_v1.5$  par la TTX n'entraîne pas de réduction supplémentaire de l'invasion. L'implication des canaux  $\text{Na}_v1.5$  dans l'invasivité cellulaire est donc dépendante de l'activité des cathepsines B et S. Il a été montré que l'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$  était responsable d'une alcalinisation intracellulaire et d'une acidification périmembranaire (Gillet et al., 2009). L'acidification périmembranaire, potentialiserait l'activité protéolytique des cathepsines B et S extracellulaires et donc l'invasivité des cellules MDA-MB-231 (Gillet et al., 2009).

L'échangeur sodium-proton NHE-1 est le principal régulateur du pH intracellulaire des cellules MDA-MB-231 et son activité participe à l'invasivité des cellules (Brisson et al., 2011). Il a été montré que l'inhibition de l'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$  dans les cellules MDA-MB-231 entraîne une diminution de l'efflux de protons par les échangeurs NHE. Cette inhibition des canaux sodiques n'a pas d'effet sur l'expression en ARNm ou en protéine de NHE-1. L'effet de  $\text{Na}_v1.5$  sur NHE-1 passerait par une régulation de l'activité de l'échangeur et non de son expression (cette hypothèse a été confirmée dans l'article ci-après). L'activité de NHE-1 induit une entrée de sodium et une sortie de protons responsable d'une acidification périmembranaire et de l'augmentation de l'activité des cathepsines extracellulaires. Ces deux protéines,  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1, sont colocalisées dans des domaines membranaires particuliers, les radeaux lipidiques riches en cavéoline-1 nommés cavéoles (Brisson et al., 2011). C'est au sein de ces domaines, concentrant de nombreuses voies de signalisation, que l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  influencerait l'activité de l'échangeur NHE-1 dans les cellules MDA-MB-231.

Les invadopodes sont des structures particulières des cellules invasives qui forment des protrusions membranaires essentielles à la dégradation et à l'invasion de la matrice extracellulaire. La cavéoline-1 et l'échangeur NHE-1 sont exprimés et impliqués dans l'activité de ces invadopodes (Albrechtsen et al., ; Busco et al., ; Caldieri et al., 2009; Magalhaes et al.) ce qui indique que des cavéoles peuvent être présentes dans ces structures. En 2009, une équipe a décrit la présence de radeaux lipidiques dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231 (Yamaguchi et al., 2009).

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'implication de  $\text{Na}_v1.5$  dans l'activité des invadopodes des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, de caractériser le lien fonctionnel entre ces deux transporteurs  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 ainsi que leurs rôles dans l'activité invadopodiale.

*B. Article*

**Na<sub>v</sub>1.5 Na<sup>+</sup> channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia**

BRISSON L., DRIFFORT V., BENOIST L., POET M., COUNILLON L., ANTELM I E., RUBINO R., BESSON P.,  
LABBAL F., CHEVALIER S., RESHKIN S.J., GORE J. AND ROGER S.

*J Cell Sci. 2013 Nov 1;126(Pt 21):4835-42. doi: 10.1242/jcs.123901. Epub 2013 Jul 31.*

# Na<sub>v</sub>1.5 Na<sup>+</sup> channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia

Lucie Brisson<sup>1</sup>, Virginie Driffort<sup>1,\*</sup>, Lauriane Benoist<sup>1,\*</sup>, Mallorie Poet<sup>2</sup>, Laurent Counillon<sup>2</sup>, Ester Antelmi<sup>3</sup>, Rosa Rubino<sup>3</sup>, Pierre Besson<sup>1</sup>, Fabien Labbal<sup>2</sup>, Stéphan Chevalier<sup>1</sup>, Stephan J. Reshkin<sup>3,‡</sup>, Jacques Gore<sup>1</sup> and Sébastien Roger<sup>1,4,‡</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

<sup>2</sup>CNRS FRE3472, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences Parc Valrose – 06108 Nice, France

<sup>3</sup>Department of Biosciences, Biotechnology and Pharmacological Sciences, University of Bari, Via Amendola 165A, I-70126 Bari, Italy

<sup>4</sup>UFR Sciences et Techniques, Département de Physiologie Animale, Université François-Rabelais de Tours, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

\*These authors contributed equally to this work

‡Authors for correspondence (stephanjoel.reshkin@uniba.it; sebastien.roger@univ-tours.fr)

Accepted 10 July 2013

Journal of Cell Science 126, 4835–4842

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.123901

## Summary

The degradation of the extracellular matrix by cancer cells represents an essential step in metastatic progression and this is performed by cancer cell structures called invadopodia. Na<sub>v</sub>1.5 (also known as SCN5A) Na<sup>+</sup> channels are overexpressed in breast cancer tumours and are associated with metastatic occurrence. It has been previously shown that Na<sub>v</sub>1.5 activity enhances breast cancer cell invasiveness through perimembrane acidification and subsequent degradation of the extracellular matrix by cysteine cathepsins. Here, we show that Na<sub>v</sub>1.5 colocalises with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 (NHE-1) and caveolin-1 at the sites of matrix remodelling in invadopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells. NHE-1, Na<sub>v</sub>1.5 and caveolin-1 co-immunoprecipitated, which indicates a close association between these proteins. We found that the expression of Na<sub>v</sub>1.5 was responsible for the allosteric modulation of NHE-1, rendering it more active at the intracellular pH range of 6.4–7; thus, it potentially extrudes more protons into the extracellular space. Furthermore, Na<sub>v</sub>1.5 expression increased Src kinase activity and the phosphorylation (Y421) of the actin-nucleation-promoting factor cortactin, modified F-actin polymerisation and promoted the acquisition of an invasive morphology in these cells. Taken together, our study suggests that Na<sub>v</sub>1.5 is a central regulator of invadopodia formation and activity in breast cancer cells.

**Key words:** Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, SCN5A, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1, Caveolae, Invadopodia, Cancer cell invasiveness

## Introduction

Breast cancer is the primary cause of death by cancer in women worldwide, and patients mostly die because of metastases. At the cellular level, a determining step in the development of metastases depends on the capacity of cancer cells to degrade and migrate through the extracellular matrix (ECM). This is performed by invadopodia, which are actin-rich organelles that protrude into the ECM and are responsible for its proteolysis through the recruitment of both membrane-associated and extracellularly released soluble proteases (Linder et al., 2011). The proteolytic activity of invadopodia is highly dependent on the acidification of the peri-invadopodial extracellular compartment (Brisson et al., 2012) through the localised activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 (NHE-1) (Busco et al., 2010; Magalhaes et al., 2011). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels (Na<sub>v</sub>) are abnormally expressed in cancer cells from different epithelial origins (e.g. breast, lung, prostate, colon and cervix) and, in melanoma, their function might be associated with cancer progression (Diaz et al., 2007; Hernandez-Plata et al., 2012; House et al., 2010; Roger et al., 2006; Roger et al., 2007; Yildirim et al., 2012). The Na<sub>v</sub>1.5 isoform (also known as SCN5A) is overexpressed in breast cancer tissues, is associated

with the development of metastases and is functional in highly invasive breast cancer cells (Fraser et al., 2005; Roger et al., 2003; Yang et al., 2012). In the highly aggressive human MDA-MB-231 breast cancer cell line, the activity of Na<sub>v</sub>1.5 enhances ECM degradation by increasing the activity of acidic cysteine cathepsins through the acidification of the pericellular microenvironment (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009). In the present study, we demonstrate that Na<sub>v</sub>1.5 interacts with NHE-1 in focal ECM degradation sites corresponding to caveolin-1-containing invadopodia. We also found that Na<sub>v</sub>1.5 activity controls Src kinase activity, cortactin phosphorylation, actin cytoskeletal dynamics and is responsible for the allosteric modulation of NHE-1, thus enhancing invadopodial proteolytic activity.

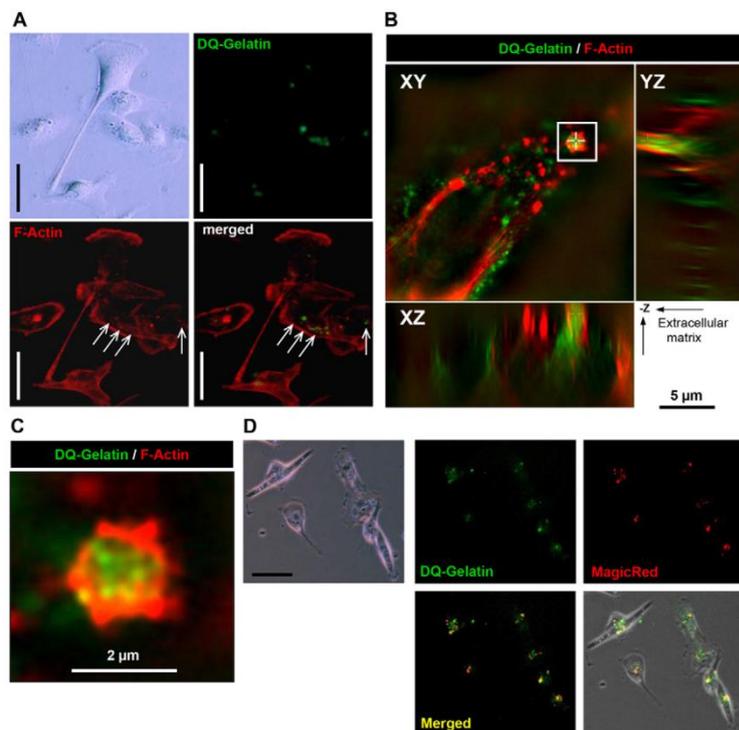
## Results and Discussion

Invadopodia are key structures involved in matrix remodelling by cancer cells (Linder, 2007). Therefore, we analysed the ability of MDA-MB-231 cells to degrade ECM by growing them on a planar matrix of Matrigel<sup>TM</sup> containing DQ-gelatin, a fluorogenic substrate for proteases. Multiple subcellular areas of degradation were observed, which we designate 'focal areas'; these

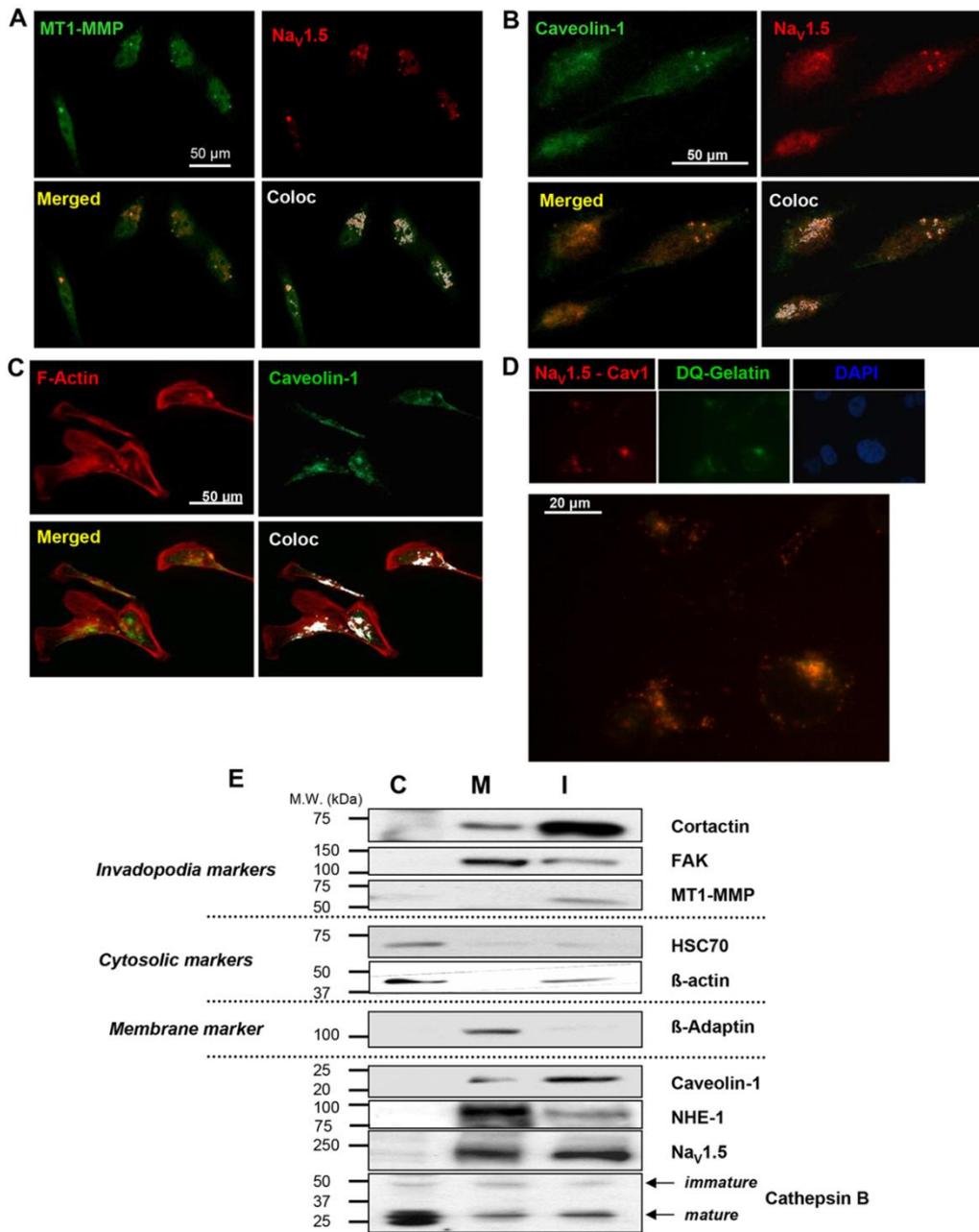
colocalised with F-actin condensations (Fig. 1A). High-resolution structured-illumination microscopy (SIM) imaging of these areas showed intense spots of matrix degradation. Approximately 10% of the studied spots were surrounded by F-actin rings, forming structures of  $\sim 2 \mu\text{m}$  in diameter in axial ( $xy$ ) sections (Fig. 1B,C). These structures can also be seen on sagittal ( $xz$ ) and coronal ( $yz$ ) projections. They were located below the cell body and showed a substantial penetration into the ECM ( $>5 \mu\text{m}$  depth) (Fig. 1B; supplementary material Fig. S1A). This F-actin organisation might correlate with that observed in electron microscopy studies in the same cancer cells (Schoumacher et al., 2010) and with the protrusive structure of podosomes observed in dendritic cells (Gawden-Bone et al., 2010). One hypothesis that is consistent with these observations is that some invadopodia show a particular structure, namely that the protrusions into the ECM have a hollow tubular shape, with the centre showing the strongest proteolytic activity. Such a structure would allow a tight control of pH and protease activity inside the invadopodium. Alternatively, these images could be interpreted as being the endocytosed degradation products inside the invadopodium.

We used a MagicRed<sup>®</sup> [MR-(RR)<sub>2</sub>] substrate assay to determine the activity of the extracellular protease cathepsin B in the MDA-MB-231 cells growing on DQ-gelatin, and found that the focal areas of DQ-gelatin degradation in the Matrigel<sup>™</sup> had an intense activity of cathepsin B (Pearson's coefficient,  $r=0.65$ , Fig. 1D). This is consistent with our previous study suggesting that cathepsin B had a substantial role in the invasion of MDA-MB-231 cells (Gillet et al., 2009). Moreover, there was a strong colocalisation between Na<sub>v</sub>1.5 channels and cathepsin B

( $r=0.82$ , supplementary material Fig. S1B). Na<sub>v</sub>1.5 also colocalised with MT1-MMP (also known as MMP14), which has been proposed to serve as a good invadopodia marker (Linder et al., 2011) ( $r=0.69$ , Fig. 2A). We have previously shown that Na<sub>v</sub>1.5 is located in caveolin-1-rich membrane fractions (caveolae) (Brisson et al., 2011). Using immunofluorescence imaging, we found a punctate labelling of Na<sub>v</sub>1.5 that was highly correlated with caveolin-1 ( $r=0.75$ , Fig. 2B). Caveolae are dynamic lipid raft platforms at the plasmalemma that allow protein clustering, and it is thought that they are important for the composition and functioning of invadopodia (Caldieri et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009) given that they could recruit multiple components required for the focal degradation of the ECM (Caldieri and Buccione, 2010; Caldieri et al., 2012; Yamaguchi and Oikawa, 2010). Here, we observed that caveolin-1 strongly colocalised with F-actin condensation loci ( $r=0.75$ , Fig. 2C). Proximity ligation assays indicated that there was a close association of Na<sub>v</sub>1.5 and caveolin-1 in areas of DQ-gelatin degradation (Fig. 2D). Fig. 2E shows that invadopodial fractions from MDA-MB-231 cells, obtained as previously described (Busco et al., 2010) and characterised by the presence of the invadopodia markers cortactin, focal adhesion kinase (FAK) and MT1-MMP, contained NHE-1 as well as caveolin-1, Na<sub>v</sub>1.5, and immature and mature forms of cathepsin B, which is the key protease in Na<sub>v</sub>1.5-dependent ECM invasion (Gillet et al., 2009). Using SIM technology, we found that Na<sub>v</sub>1.5 and NHE-1 were strongly colocalised ( $r=0.92$ ) in restricted domains protruding into the extracellular matrix (Fig. 3A; supplementary material Fig. S1C). Because the SIM apparatus is only equipped with two lasers, we assessed the



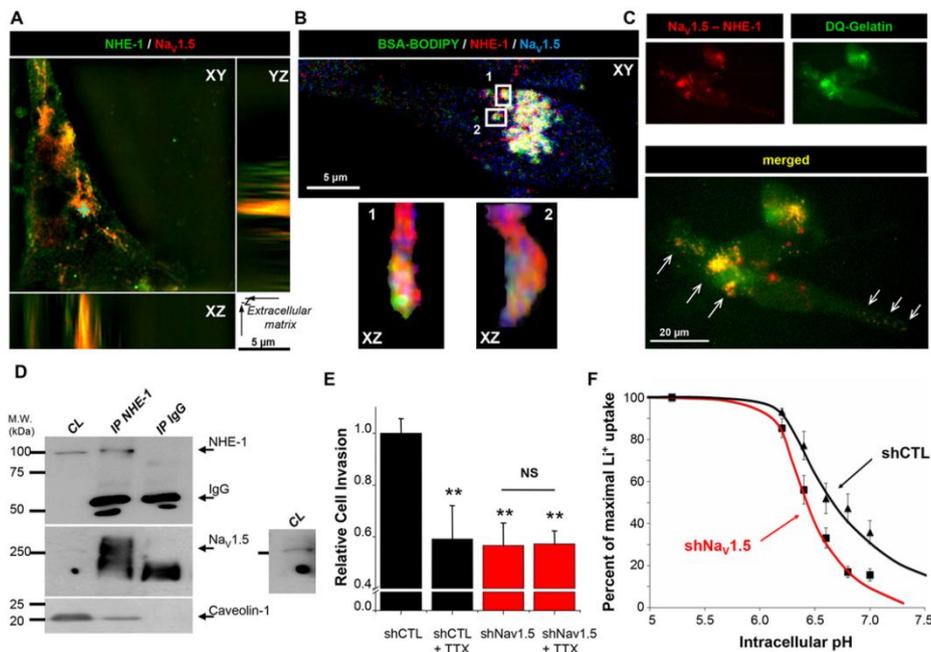
**Fig. 1. Characterisation of invadopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells.** Cells were grown for 24 hours on a planar matrix of Matrigel<sup>™</sup> containing DQ-Gelatin<sup>®</sup>. (A) F-actin staining with phalloidin-Alexa594 (red) showing high-density sub-cellular structures (white arrows). Cleaved DQ-gelatin<sup>®</sup> was detected in 'focused' areas under the cancer cells (green), close to F-actin condensations (merged). Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . (B,C) SIM imaging of invadopodia defined as being dense F-actin circular structures (red) colocalised with *in situ* matrix degradation (green). (B) Invadopodium in an axial plan (XY) with a proteolytic spot (green) surrounded by F-actin structures (boxed region). YZ and XZ projections from the selected area (white cross) show the insertion of this protrusive structure into the ECM. (C) Enlargement of the invadopodial section colocalised in B. (D) Fluorescence imaging showing the colocalisation of proteolytic spots (green) with cathepsin B activity in the extracellular matrix [MagicRed<sup>™</sup> substrate, MR-(RR)<sub>2</sub>, red staining]. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 2.** Na<sub>v</sub>1.5 localises with caveolin-1 in invadopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells. (A–C) Immunofluorescence imaging performed on MDA-MB-231 breast cancer cells grown on Matrigel™ and showing focal areas of strong colocalisation (Coloc, white pixels) between (A) MT1-MMP (green) and Na<sub>v</sub>1.5 (red), (B) caveolin-1 (green) and Na<sub>v</sub>1.5 (red), and (C) spots of F-actin (phalloidin–Alexa594, red) and caveolin-1 (green). (D) *In situ* proximity ligation assays (DUOLINK In cell colIP) showing a strong proximity between Na<sub>v</sub>1.5 and caveolin-1 (red dots) in areas of matrix degradation (green). (E) Invadopodia (I) entrapped into a 2% gelatin matrix were fractionated and separated from cytosol (C)- and membrane (M)-enriched fractions. The quality of the fractions was assessed using invadopodia (cortactin, FAK, MT1-MMP), cytosolic (HSC70, β-actin) and membrane (β-adaptin) markers.

colocalisation of Na<sub>v</sub>1.5 and/or NHE-1 with ECM degradation spots in invadopodia by using confocal imaging of cells seeded on a layer of Matrigel™ containing BSA-BODIPY-FL. This showed

that there were multiple protruding organelles involved in matrix proteolysis at the underside of the cell body, which strongly colocalised with NHE-1 and Na<sub>v</sub>1.5 (Fig. 3B, supplementary



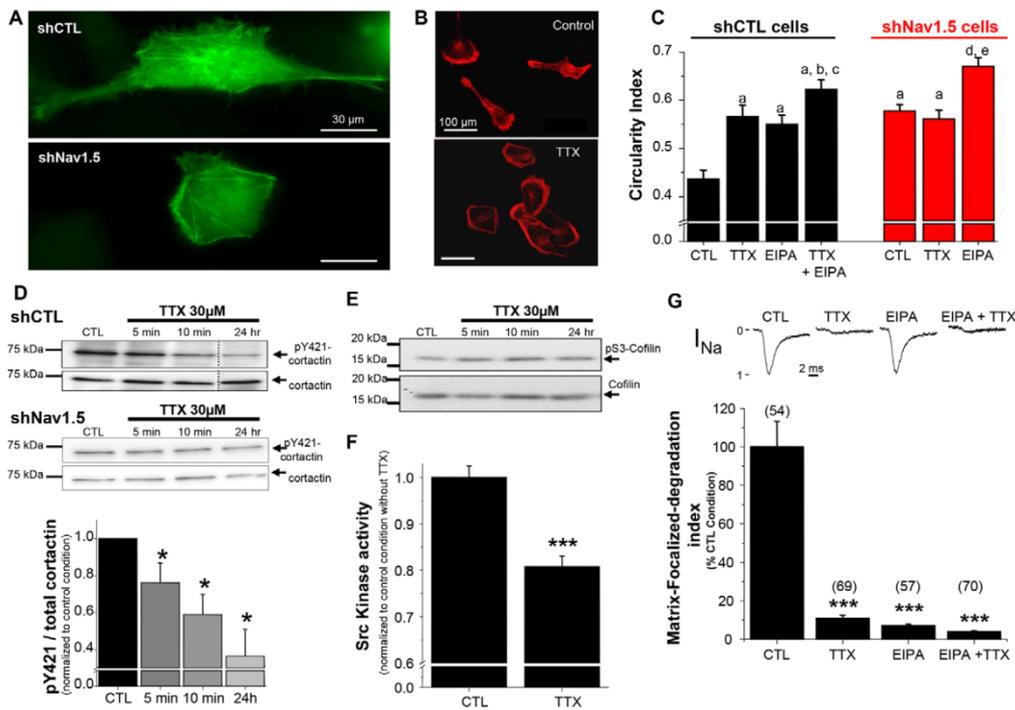
**Fig. 3.  $\text{Na}_V1.5$  interacts with, and allosterically modulates NHE-1 function.** (A) SIM immunofluorescence imaging of NHE-1 (green) and  $\text{Na}_V1.5$  (red) performed on a MDA-MB-231 breast cancer cell grown on Matrigel<sup>TM</sup> and showing spots of strong colocalisation (XY) corresponding to structures protruding into the ECM, as observed with XZ and YZ projections from the selected area (blue cross). (B) Confocal imaging of NHE-1 (red) and  $\text{Na}_V1.5$  (blue) from a cell cultured on BSA-BODIPY-FL-containing matrix, which releases green fluorescence when degraded. Numerous focal zones of degradation were identified in axial sections (XY), which showed colocalisation with NHE-1 and  $\text{Na}_V1.5$ . Two areas (1 and 2) were selected and analyzed in sagittal sections (XZ) demonstrating a strong colocalisation of NHE-1 and  $\text{Na}_V1.5$  and showed protrusive structure in the areas of matrix degradation. (C) Proximity ligation assays from MDA-MB-231 cells grown on Matrigel<sup>TM</sup> and showing spots of strong colocalisation (red spots) and NHE-1 almost completely limited (see arrows) to areas of focal digestion (green). (D) NHE-1 was detected in total cell lysates (CL) and was immunoprecipitated (IP NHE-1) with an anti-NHE-1 antibody. Anti-immunoglobulin was used as a negative control to rule out non-specific binding in the immunoprecipitation (IP IgG). On the right, is an image that was obtained with a longer exposure time to enable the detection of  $\text{Na}_V1.5$  in CL. (E) Relative matrix invasion by shCTL and sh $\text{Na}_V1.5$  MDA-MB-231 cells in presence or absence of TTX (30  $\mu\text{M}$ ) ( $n=4$ ). \*\* $P<0.01$  compared with shCTL; NS, not significant. (F) Initial rates of the NHE-1 exchanger measured using the fast kinetics of  $\text{Li}^+$  uptake. Dose–response curves for the NHE-1 activity in the sh $\text{Na}_V1.5$  (squares) and shCTL (triangles) cells at different intracellular pH values are shown.

material Fig. S1D). Proximity ligation assays also confirmed the close vicinity of NHE-1 and  $\text{Na}_V1.5$  in focused matrix degradation spots (Fig. 3C). As can be seen in Fig. 3D, both  $\text{Na}_V1.5$  and caveolin-1 coimmunoprecipitated with NHE-1, consistent with a (direct or indirect) interaction between these three membrane proteins. By contrast,  $\text{Na}_V1.5$  and caveolin-1 were not immunodetected when a control IgG was used for precipitation.

NHE-1 is ubiquitously expressed at the plasma membrane of all mammalian cells, has a very low activity at the physiological intracellular pH (pHi) and activates rapidly when the cytoplasm becomes acidic, following a dimeric Monod–Wyman–Changeux cooperative mechanism (Lacroix et al., 2004). We next decided to investigate whether the presence of  $\text{Na}_V1.5$  in breast cancer cells could modify the sensitivity of NHE-1 to internal protons. To do so, we constructed two stable cell lines derived from MDA-MB-231 cells: one expressing a shRNA targeting the expression of the *SCN5A* (sh $\text{Na}_V1.5$ ) and another one expressing a shRNA that does not target any known gene (shCTL). Sh $\text{Na}_V1.5$  reduced the mRNA expression of *SCN5A* gene by  $\sim 80\%$ , which resulted in the complete disappearance of  $\text{Na}^+$  currents in these cells (supplementary material Fig. S2A–C). Treating shCTL cells with

30  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX) to block  $\text{Na}^+$  currents reduced the relative invasion by  $\sim 40\%$  (Fig. 3E) without affecting cell viability (supplementary material Fig. S3C) or proliferation (Gillet et al., 2009). Sh $\text{Na}_V1.5$  cells had a  $\sim 40\%$  reduced invasion compared to shCTL cells, and TTX had no supplementary effect. We then measured NHE-1 activity as a function of pHi, by measuring the fast kinetics of  $\text{Li}^+$  uptake, and showed that the presence of active  $\text{Na}_V1.5$  channels in MDA-MB-231 cancer cells significantly ( $P<0.05$ ) increased  $\text{Li}^+$  uptake in pH range 6.4 to 7 (Fig. 3F; supplementary material Fig. S2D). The change in cooperativity strongly suggests that  $\text{Na}_V1.5$  function in cancer cells allosterically increases NHE-1 activity in neutral ranges of pHi.

MDA-MB-231 cancer cells display a ‘fibroblast-like’ shape when grown on a planar layer of Matrigel<sup>TM</sup>, exhibiting a rich F-actin labelling in the barbed-end of the lamellipodial leading edge, as well as at the rear of the cell. This shape, characteristic of highly invasive cells, was lost when cells did not express  $\text{Na}_V1.5$  channels or were treated with TTX (Fig. 4A,B). In these two cases the F-actin cytoskeleton was disturbed, showed uniform submembrane localisation and was associated with a change in cell morphology characterised by the increase of the



**Fig. 4.** Nav1.5 controls F-actin cytoskeleton, cell morphology and foci of matrix degradation in MDA-MB-231 cancer cells. (A) shCTL and shNav1.5 cells were transfected with LifeAct-GFP to visualize the striking differences in F-actin cytoskeleton and cell morphology between both MDA-MB-231-derived cell types. (B) Representative photographs of shCTL cells cultured on a Matrigel™ treated with vehicle (control) or 30 μM TTX. The F-actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa594. (C) Experiments described in B were performed in either shCTL and shNav1.5 cancer cells that were either untreated (CTL) or treated with TTX (30 μM), or EIPA (1 μM) or a combination of TTX + EIPA. A cell circularity index was calculated using ImageJ© software for each the cell type and different treatment ( $n=45-208$  cells analysed). Statistically different at  $P<0.001$ : a, from shCTL, CTL condition; b, from shCTL, TTX condition; c, from shCTL, EIPA condition; d, from shNav1.5, CTL condition; e, from shNav1.5, TTX condition. (D) Upper panel, blots showing pY421-cortactin and total cortactin in non-treated (CTL) or 5 minutes, 10 minutes or 24 hours with 30 μM TTX-treated shCTL cells. Same experiments were performed in shNav1.5 cancer cells. Lower panel, a quantification of pY241 relative to total cortactin (normalised to the control condition) from shCTL cells ( $n=5$ ).  $*P<0.05$ . (E) Blots showing pS3-cofilin and total cofilin levels in shCTL cells treated for 5 minutes, 10 minutes or 24 hours with 30 μM TTX or non-treated (CTL) ( $n=3$ ). (F) Src kinase activity was assessed from total shCTL cell lysates after a 10-minute long treatment with 30 μM TTX or with a control solution (CTL, vehicle), and the activity was normalised to the control condition.  $***P<0.001$ . (G) MDA-MB-231 cells were cultured on Matrigel™ containing DQ-Gelatin®. Invadopodial activities were assessed from untreated cells (CTL) or from cells treated with 30 μM TTX or 1 μM EIPA or a combination of TTX plus EIPA. A 'Matrix-Focalised-degradation activity index' was calculated, as indicated in supplementary material Fig. S4, for each treatment.  $***P<0.001$ . Representative  $I_{Na^+}$  currents ( $I_{Na}$ ) in each treatment, normalised to the maximal current recorded in the control condition, recorded for a depolarisation from  $-100$  to  $-5$  mV, are shown above the graph.

circularity index of cancer cells (Fig. 4C). The actin-nucleation-promoting factor cortactin (encoded by the gene *CTTN*) is a crucial regulator of the actin cytoskeletal dynamics and, consequently, of the formation and function of invadopodia. Cortactin is known to bind (through a SH3 domain) and to activate the Arp2/3 complex, which is responsible for the formation of branched F-actin and the enhancement of cell migration (MacGrath and Koleske, 2012). Cortactin also binds and inhibits the actin-severing protein cofilin (encoded by the gene *CFL1*). The phosphorylation of cortactin releases cofilin and leads to the increase of polymerizing actin barbed ends (Oser et al., 2009). By performing prognostic analyses of gene expression in cohorts of breast cancer patients (bc-GenExMiner v3.0; <http://bcgenex.centregauducheau.fr>; Jézéquel et al., 2012) we found that the overexpression of both *CTTN* [ $P<0.0001$ ; hazard ratio (a measure of survival in patients with the condition

compared with that of those without), 1.49, 95% confidence interval, 1.26–1.70] and *CFL1* ( $P<0.0001$ ; hazard ratio 1.40, 95% confidence interval, 1.19–1.64) genes were associated with a reduced survival without metastatic relapse (supplementary material Fig. S3A,B) indicating the crucial role of these proteins in cancer cell invasion and the development of metastases. Here, we found that inhibiting NHE-1 by the use of ethyl-isopropylamiloride (EIPA) also increased cell circularity in both shCTL and shNav1.5 cells (Fig. 4C). This could be because the activity of cofilin is pH dependent, and, hence, the intracellular alkalisation induced by NHE-1 activity might disrupt the interaction between cofilin and cortactin thus enhancing the initiation of actin polymerisation (Frantz et al., 2008; Pope et al., 2004). However, there are partially additive effects on cell circularity when combining both TTX and EIPA as compared with the use of one of these two inhibitors separately. We

hypothesise that, independently of its regulation of NHE-1 activity,  $\text{Na}_v1.5$  could modulate F-actin polymerisation and invadopodia formation. Cortactin can also be released from cofilin when phosphorylated on tyrosine residues (Y421 and Y466) by Src kinase, which regulates its ability to promote branched actin nucleation by modulating its ability to recruit binding partners (Oser et al., 2010; Oser et al., 2009). We found that inhibiting the activity of  $\text{Na}_v1.5$  channels with TTX, which had no effect on cell viability (supplementary material Fig. S3C), rapidly reduced the level of pY421-cortactin [by  $26.4 \pm 8.7\%$  after 5 minutes,  $36.0 \pm 9.8\%$  after 10 minutes and by  $48.5 \pm 16.2\%$  after 24 hours] (Fig. 4D). This was not due to a general dephosphorylation mechanism (supplementary material Fig. S3D–F) and was not observed in cells that did not express  $\text{Na}_v1.5$  (sh $\text{Na}_v1.5$ ). An analysis of the levels of pY421-cortactin at various time points of the TTX treatment, revealed that there were reductions in the amount of pY421-cortactin at all time points analyzed (5, 10, 20 and 30 minutes, and 1, 2 and 24 hours of treatment) compared to the control conditions (data not shown). By contrast, blocking  $\text{Na}_v1.5$  had no effect on the phosphorylation of cofilin on S3 (Fig. 4E), which has been shown to be critical for binding to actin (Arber et al., 1998). This suggests that  $\text{Na}_v1.5$  might regulate Src kinase and not LIM kinase. Indeed, we found that TTX induced a reduction in Src kinase activity (Fig. 4F). As a result, a reduction of both invadopodia formation and activity was expected upon inhibition  $\text{Na}_v1.5$ . The number of pixels corresponding to the colocalisation of F-actin condensation areas and focal spots of DQ-gelatin proteolysis were quantified per cell, giving a ‘matrix-focalised-degradation index’ (Fig. 4G; supplementary material Fig. S4). Inhibiting  $\text{Na}_v1.5$  with TTX, and NHE-1 with EIPA, resulted in 89% and 93% inhibition of the matrix focal degradation, respectively. Combining TTX and EIPA reduced matrix degradation by 96% (Fig. 4G).

Voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels ( $\text{Na}_v$ ) have long been considered as being characteristic of excitable cells (Catterall, 2012). However, different  $\text{Na}_v$  isoforms have been found in non-excitable cancer cells and their function enhances cancer cell invasiveness (Roger et al., 2006). In highly invasive breast cancer cells and in high-grade breast cancer biopsies, the overexpression of the  $\text{Na}_v1.5$  isoform has been associated with ECM remodelling and an increased probability of developing metastases (Gillet et al., 2009; Yang et al., 2012). Indeed,  $\text{Na}_v1.5$  promotes ECM proteolysis through NHE-1-dependent acidic activation of the extracellular cathepsins B and S (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009). NHE-1 is already known to have a substantial role in extracellular acidification and in the invasiveness of cancer cells (Bourguignon et al., 2004; Busco et al., 2010; Cardone et al., 2005; Stock and Schwab, 2009), and any signalling pathway increasing its activity could make cancer cells become more aggressive. In this study, we showed for the first time that  $\text{Na}_v1.5$  interacts with and allosterically increases NHE-1 activity in a range of pHi between 6.4 and 7.0. We propose that these interactions occur in caveolae of the invadopodial compartment and are responsible for an increased ECM degradative activity. Indeed, caveolae are membrane domains that ‘build’ protein–protein signalling complexes (Harvey and Calaghan, 2012) that are required for both invadopodia formation and ECM degradative activity (Caldieri et al., 2012; Caldieri et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009). As such, caveolae could be a signalling platform in

invadopodia for  $\text{Na}_v$ - and NHE-1-dependent cancer cell invasiveness. Because of their invaginated structure, caveolae also provide a space with restricted diffusion for ionic fluxes that could be responsible for local changes in membrane potential and signalling cascades. We also found that  $\text{Na}_v1.5$  function in cancer cells enhanced Src kinase activity and Y421 cortactin phosphorylation, which could contribute to the acquisition of an aggressive phenotype. Although the mechanism has not yet been elucidated, this could be in line with the observation that membrane depolarisation regulates the actin polymerisation:actin depolymerisation ratio and thus, the F-actin network directly under the plasmalemma (Callies et al., 2011). This effect on actin polymerisation could also be dependent on the interaction of actin with NHE-1 through the association with actin-binding proteins of the ERM (ezrin, radixin and moesin) family (Baumgartner et al., 2004; Cardone et al., 2005).

$\text{Na}_v$  channels have also been identified in other invasive cells, such as macrophages (Carrithers et al., 2007) and microglial cells (Black and Waxman, 2012), and blocking their activity has been shown to reduce cell invasiveness. It has also been proposed that this effect depends on the regulation of formation of podosomes (Carrithers et al., 2009).

In conclusion, we have shown that  $\text{Na}_v1.5$  channels promote the degradative invadopodial activity in breast cancer cells, both by modifying the F-actin cytoskeleton and enhancing the activity of NHE-1. The participation of  $\text{Na}_v$  channels in the constitution and activity of ECM degrading compartments could be a general feature shared by invasive cancer and non-cancer cells.

## Materials and Methods

### Inhibitors, chemicals and antibodies

Tetradotoxin was purchased from Latoxan (France). Fluorescent probes were purchased from Tebu-Bio (France). Other drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

### Cell culture and cell lines

MDA-MB-231 human breast cancer cells were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), and grown at 37°C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator.

We constructed a lentiviral vector encoding a short hairpin RNA (shRNA) specifically targeting human *SCN5A* transcripts using the same protocol as previously described (Jelassi et al., 2011). Briefly, the sequence encoding sh $\text{Na}_v1.5$  was obtained by PCR elongation of two partially complementary primers: 5'-GGATCCCCAAGGCACAAAGTGCCTGCGCAATTCAGAGA-3' and 5'-AAGCTTAAAAAAGGCACAAAGTGCCTGCGCAATCTCTTGAA-3'. We also constructed a lentiviral vector expressing an untargeted shRNA (pLenti-shCTL), by using the following primers: 5'-GGATCCCCCGCCGACCAATTCACGGCCGTTCAGAGACG-3' and 5'-AAGCTTAAAAAAGCCGACCAATTCACGGCCGTCTTGAACG-3'. These experiments resulted in sh $\text{Na}_v1.5$  and shCTL cell lines. Cell viability was assessed as previously described (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009).

### Cellular electrophysiology

Patch pipettes were pulled from borosilicate glass to a resistance of 4–6 M $\Omega$ .  $\text{Na}^+$  currents were recorded, in whole-cell configuration, under voltage-clamp mode using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument, USA) as previously described (Gillet et al., 2009). The external  $\text{Na}^+$  solution was (in mM): NaCl 140, KCl 4,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  2, D-glucose 11.1, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH (1M). The external  $\text{Li}^+$  solution used LiCl 140 mM to replace NaCl. Intrapipette solution was (in mM): K-Glutamate 125, KCl 20,  $\text{CaCl}_2$  0.37,  $\text{MgCl}_2$  1, Mg-ATP 1, EGTA 1, HEPES 10, adjusted to pH 7.2.

### In vitro invasion assays

Cell invasiveness was analysed as previously described (Brisson et al., 2011) using culture inserts with an 8- $\mu\text{m}$  pore size filter covered with Matrigel<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, France).

**Measurement of initial rates of NHE-1 functioning**

Cells seeded on 24-well plates were acidified in Li<sup>+</sup>- and Na<sup>+</sup>-free solutions containing 2.5 μM nigericin and 140 mM KCl, and were calibrated at various pH values ranging from 5.2 to 7.2 as previously described (Lacroix et al., 2004; Milosavljevic et al., 2010). Measurements were performed after a 3-minute incubation in the uptake medium supplemented with 3 mM LiCl, followed by four rapid rinses in ice-cold PBS. Cells were solubilised in 0.25M nitric acid, and Li<sup>+</sup> was measured using atomic absorption spectrometry (Zeeman furnace system, Thermo Scientific). The initial rates of NHE-1 were calculated as the EIPA (10 μM)-sensitive Li<sup>+</sup> accumulation per well divided by the protein quantity.

**Invadopodial fractionation**

Invadopodia, embedded into a thick layer of gelatin, were isolated and separated from cytosolic and membrane fractions as previously described (Busco et al., 2010). Primary antibodies used were: mouse anti-NHE1 (Chemicon), mouse anti-HSC70 (Santa-Cruz Biotechnology), rabbit anti-caveolin-1 (Cell Signaling), goat anti-β-actin (BD Biosciences), rabbit anti-human Na<sub>v</sub>1.5 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-focal adhesion kinase (FAK, Santa-Cruz Biotechnology) and rabbit anti-human cathepsin B (Fitzgerald).

**Coimmunoprecipitations and western blotting**

Cells were washed with PBS and lysed in presence of a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1 mM EDTA), containing 1% Triton-X-100 and protease inhibitors. Coimmunoprecipitations (co-IP) experiments were performed using Bio-Ademeads PAG magnetic beads (Ademtech, France) according to standard protocols. Two types of lysate-antibody mixes were prepared and incubated overnight at 4°C. Each mix contained 500 μg total cell lysate in 500 μl lysis buffer and 1 μg antibody (mouse anti-NHE1 or mouse control IgG). Cortactin and cofilin were immunodetected using mouse anti-cortactin, rabbit anti-pY421 cortactin, rabbit anti-cofilin and rabbit anti-pS3 cofilin antibodies, respectively (all from Millipore).

**Fluorescence imaging**

Cells were cultured on Matrigel<sup>TM</sup> (4 mg/ml)-coated coverslips for 24 hours then washed in PBS, fixed with 3.7% ice-cold paraformaldehyde in PBS. For confocal imaging, cells were permeabilised with 0.1% Triton X-100 and saturated with 0.1% gelatin in PBS. For epifluorescence and SIM imaging, they were permeabilised with a solution containing 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1% BSA and 0.02% saponin, and saturated in 3% BSA and 3% normal goat serum (NGS). Coverslips were incubated with primary antibodies then washed with 0.1% BSA in PBS and incubated with secondary fluorescent-conjugated antibodies. F-actin was stained with phalloidin-Alexa594. Primary antibodies used were anti-human Na<sub>v</sub>1.5 (Sigma-Aldrich), anti-NHE1 (Abcam 4E9, or Santa-Cruz 4E9), anti-caveolin 1 (Cell Signaling). Fluorescent-conjugated antibodies used were anti-rabbit-Ig-TexasRed, anti-rabbit-Ig-AlexaFluor488, anti-goat-Ig-DyLight488, anti-rabbit-Ig-AlexaFluor350, anti-mouse-Ig-AlexaFluor568 and anti-mouse-Ig-AlexaFluor488. MagicRed substrate [MR-(RR)<sub>2</sub>, 1:1000, Immunochemistry Technologies] was used to assess cathepsin B activity. In some experiments, cells were transfected with LifeAct-TagGFP2 plasmids (Ibidi) allowing the visualisation of F-actin dynamics in living cells.

**Epifluorescence imaging**

Gelatinolytic activity was assessed by culturing cells for 24 hours on a planar Matrigel<sup>TM</sup> matrix containing 25 μg/ml DQ-Gelatin<sup>®</sup>. Epifluorescence microscopy was performed with a Nikon Ti-S microscope and analysed using both NIS-BR software (Nikon, France) and ImageJ<sup>®</sup> software 1.38I (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A circularity index was calculated as  $\frac{4\pi \times \text{area}}{\text{perimeter}^2}$ . A value approaching 0 indicates an increasingly elongated shape, whereas a value of 1.0 indicates a perfect circle. Pearson's coefficients were calculated with the ImageJ colocalisation plugin.

**SIM imaging**

SIM experiments were performed at the Nikon Imaging Center at the Institut Curie-CNRS (Paris), using a Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with a MCL Piezo stage, two lasers (488 nm, 100 mW and 561 nm 100 mW), a 100× CFI Plan Apo TIRF (NA 1.49) oil immersion objective and an EM-CCD Camera iXon DU897 (Andor).

**Confocal imaging**

Cells were seeded on a layer of Matrigel<sup>TM</sup> (4 mg/ml) containing a substrate for digestion localisation (BSA-BODIPY-FL, 30 μg/mL) and observed at 600× magnification using a oil immersion objective with a Leica TCS SP5 II AOBs laser scanning confocal microscope equipped with He/Ne-633 and Argon-488 lasers with 495–519 (B2-A) and 642–660 (Cy5) nm excitation filters. Proximity ligation assays were performed according to standard protocols using the Duolink<sup>®</sup> 'In-cell Co-IP' kit (OLink Biosciences) (Söderberg et al., 2006).

**Measurements of Src family kinase activity**

Src kinase activity was assessed using the ProFluor<sup>®</sup> Src family kinase assay (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. shCTL MDA-MB-231 cells were treated for 10 minutes with 30 μM TTX or with a control solution (CTL, vehicle), then were lysed. Src kinase activities were assessed from total cell lysate samples containing 3 μg total proteins.

**Statistical analyses**

Data are displayed as mean ± s.e.m. (*n*=sample size). Student's *t*-tests were used to compare groups showing Gaussian distributions and homogenous variances, alternatively a Mann-Whitney rank sum test was performed. Statistical significance is indicated as: \**P*<0.05; \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001.

**Acknowledgements**

We thank I. Domingo and C. Le Roy for technical and administrative assistance, J.-C. Pagès, C. Collin, M.-L. Jourdan and V. Joulin for the development of shRNA and the Nikon Imaging Center at the Institute Curie-CNRS Paris.

**Author contributions**

L. Brisson, V.D., L. Benoist, M.P., L.C. E.A., R.R., F.L. performed experiments. Experiments were conceived and designed by L. Brisson, L.C., P.B., S.J.R., J.G and S.R. Data were analysed and interpreted by L. Brisson, L.C., P.B., S.C., S.J.R., J.G and S.R. Overall supervision of work was performed by S.J.R., J.G and S.R. The paper was written by S.J.R. and S.R.

**Funding**

This work was supported by the 'Ministère de la Recherche et des Technologies'; the Inserm; the 'Ligue Nationale Contre le Cancer'; the 'Programme Hubert Curien – Galileo' (Campus France); and the 'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro' (AIRC) [grant number 11348 to S.J.R.]. The SJR laboratory is part of the Italian network 'Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi' (INBB), the Centro di Eccellenza di Genomica in Campo Biomedico ed Agrario of the University of Bari and the project BioBoP of the Region Puglia.

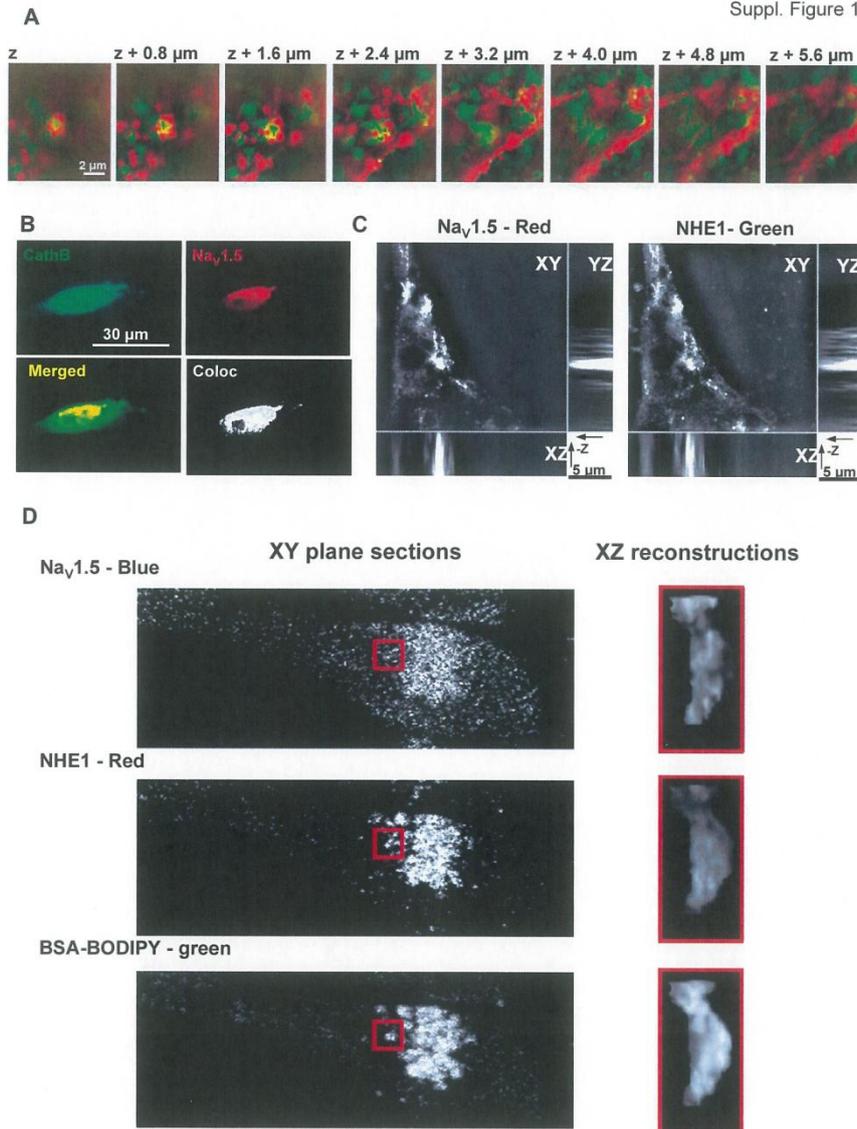
Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.123901/-/DC1>

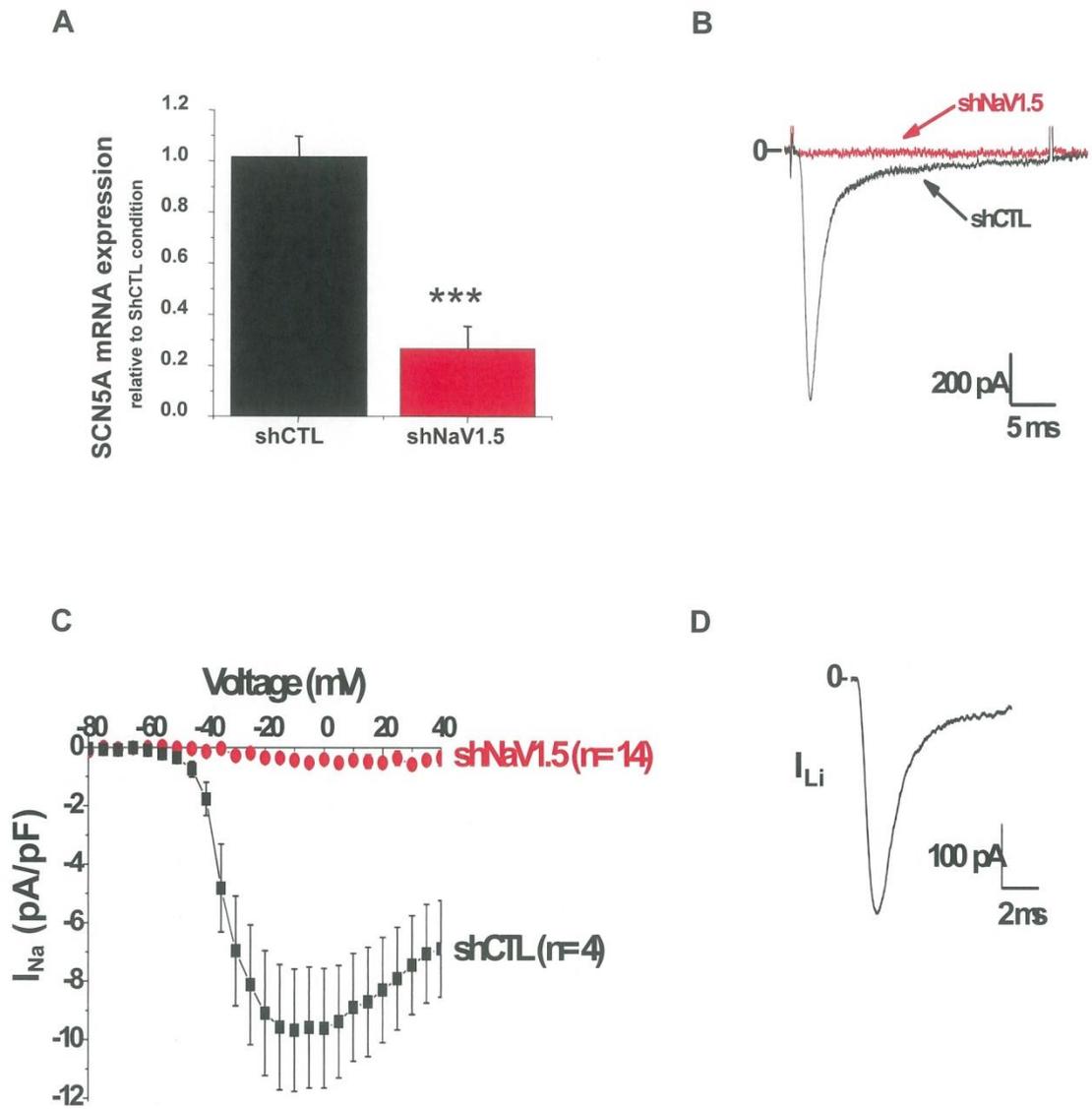
**References**

- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-809.
- Baumgartner, M., Patel, H. and Barber, D. L. (2004). Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *Am. J. Physiol.* **287**, C844-C850.
- Black, J. A. and Waxman, S. G. (2012). Sodium channels and microglial function. *Exp. Neurol.* **234**, 302-315.
- Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. and Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* **279**, 26991-27007.
- Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J. Y., Roger, S. and Gore, J. (2011). Na<sup>(V)</sup>1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H<sup>(+)</sup> efflux in caveolae. *Oncogene* **30**, 2070-2076.
- Brisson, L., Reshkin, S. J., Goré, J. and Roger, S. (2012). pH regulators in invadosomal functioning: proton delivery for matrix tasting. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 847-860.
- Busco, G., Cardone, R. A., Greco, M. R., Bellizzi, A., Colella, M., Antelmi, E., Mancini, M. T., Dell'Aquila, M. E., Casavola, V., Paradiso, A. et al. (2010). NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J.* **24**, 3903-3915.
- Caldieri, G. and Buccione, R. (2010). Aiming for invadopodia: organizing polarized delivery at sites of invasion. *Trends Cell Biol.* **20**, 64-70.
- Caldieri, G., Giacchetti, G., Beznoussenko, G., Attanasio, F., Ayala, I. and Buccione, R. (2009). Invadopodia biogenesis is regulated by caveolin-mediated modulation of membrane cholesterol levels. *J. Cell. Mol. Med.* **13** **8B**, 1728-1740.
- Caldieri, G., Capestrano, M., Bicanova, K., Beznoussenko, G., Baldassarre, M. and Buccione, R. (2012). Polarised apical-like intracellular sorting and trafficking regulates invadopodia formation and degradation of the extracellular matrix in cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 961-968.

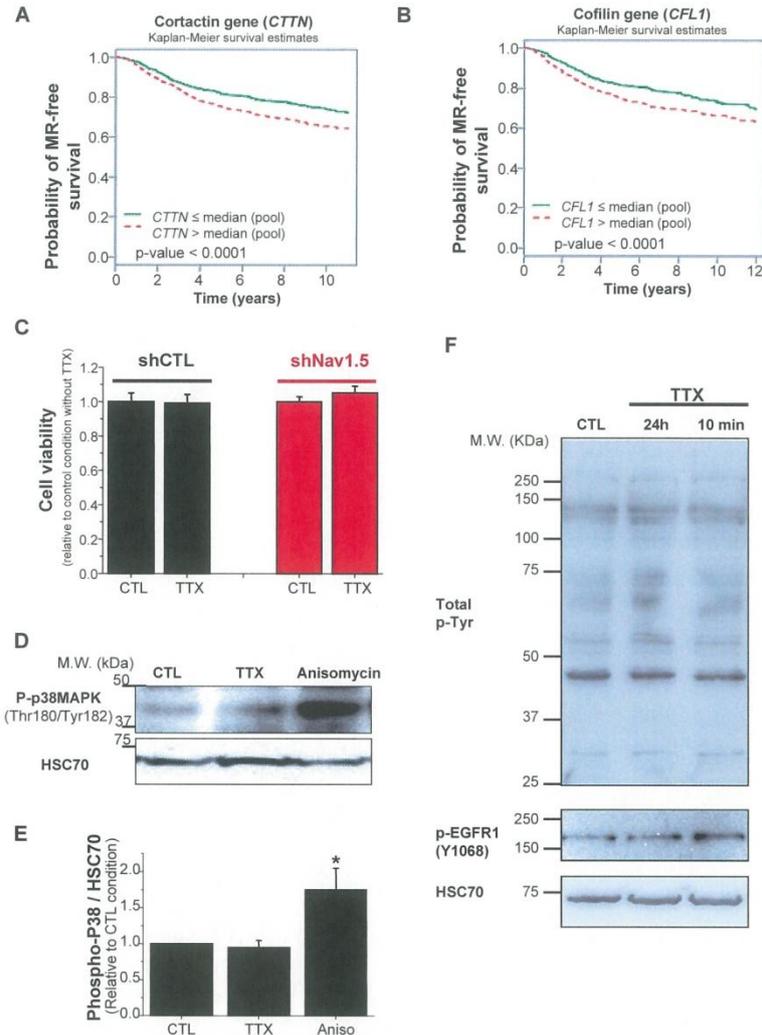
- Callies, C., Fels, J., Liashkovich, I., Kliche, K., Jeggle, P., Kusche-Vihrog, K. and Oberleithner, H. (2011). Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 1936-1942.
- Cardone, R. A., Casavola, V. and Reshkin, S. J. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 786-795.
- Carrithers, M. D., Dib-Hajj, S., Carrithers, L. M., Tokmouline, G., Pypaert, M., Jonas, E. A. and Waxman, S. G. (2007). Expression of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J. Immunol.* **178**, 7822-7832.
- Carrithers, M. D., Chatterjee, G., Carrithers, L. M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M. and Waxman, S. G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *J. Biol. Chem.* **284**, 8114-8126.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* **590**, 2577-2589.
- Diaz, D., Delgado, D. M., Hernández-Gallegos, E., Ramírez-Domínguez, M. E., Hinojosa, L. M., Ortiz, C. S., Berumen, J., Camacho, J. and Gomora, J. C. (2007). Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J. Cell. Physiol.* **210**, 469-478.
- Frantz, C., Barreiro, G., Domínguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M. J., Jacobson, M. P. and Barber, D. L. (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J. Cell Biol.* **183**, 865-879.
- Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z. et al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5381-5389.
- Gawden-Bone, C., Zhou, Z., King, E., Prescott, A., Watts, C. and Lucocq, J. (2010). Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *J. Cell Sci.* **123**, 1427-1437.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G. and Le Guennec, J. Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 8680-8691.
- Harvey, R. D. and Calaghan, S. C. (2012). Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 366-375.
- Hernández-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martínez, L., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M. and Gomora, J. C. (2012). Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int. J. Cancer* **130**, 2013-2023.
- House, C. D., Vaske, C. J., Schwartz, A. M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R. L., Hales, T. G. et al. (2010). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res.* **70**, 6957-6967.
- Jelassi, B., Chantôme, A., Alcaraz-Pérez, F., Baroja-Mazo, A., Cayuela, M. L., Pelegrin, P., Surprenant, A. and Roger, S. (2011). P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cysteine cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene* **30**, 2108-2122.
- Jézéquel, P., Campone, M., Gouraud, W., Guérin-Charbonnel, C., Leux, C., Ricolleau, G. and Campion, L. (2012). bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **131**, 765-775.
- Lacroix, J., Poët, M., Maehrel, C. and Counillon, L. (2004). A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. *EMBO Rep.* **5**, 91-96.
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* **17**, 107-117.
- Linder, S., Wiesner, C. and Himmel, M. (2011). Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 185-211.
- MacGrath, S. M. and Koleske, A. J. (2012). Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 1621-1626.
- Magalhaes, M. A., Larson, D. R., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Gil-Henn, H., Oser, M., Chen, X., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2011). Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **195**, 903-920.
- Milosavljevic, N., Duranton, C., Djerbi, N., Puech, P. H., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M. T., Rauch, C., Tauc, M., Counillon, L. et al. (2010). Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res.* **70**, 7514-7522.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.* **186**, 571-587.
- Oser, M., Mader, C. C., Gil-Henn, H., Magalhaes, M., Bravo-Cordero, J. J., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2010). Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J. Cell Sci.* **123**, 3662-3673.
- Pope, B. J., Zierler-Gould, K. M., Kühne, R., Weeds, A. G. and Ball, L. J. (2004). Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 4840-4848.
- Roger, S., Besson, P. and Le Guennec, J. Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **1616**, 107-111.
- Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P. and Le Guennec, J. Y. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr. Pharm. Des.* **12**, 3681-3695.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P. I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y. and Le Guennec, J. Y. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 774-786.
- Schoumacker, M., Goldman, R. D., Louvard, D. and Vignjevic, D. M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J. Cell Biol.* **189**, 541-556.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K. J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L. G. et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* **3**, 995-1000.
- Stock, C. and Schwab, A. (2009). Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch.* **458**, 981-992.
- Yamaguchi, H. and Oikawa, T. (2010). Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget* **1**, 320-328.
- Yamaguchi, H., Takeo, Y., Yoshida, S., Kouchi, Z., Nakamura, Y. and Fukami, K. (2009). Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 8594-8602.
- Yang, M., Kozminski, D. J., Wold, L. A., Modak, R., Calhoun, J. D., Isom, L. L. and Brackenbury, W. J. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na<sup>(v)</sup>1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 603-615.
- Yildirim, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A. and Djamgoz, M. B. (2012). Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett.* **323**, 58-61.



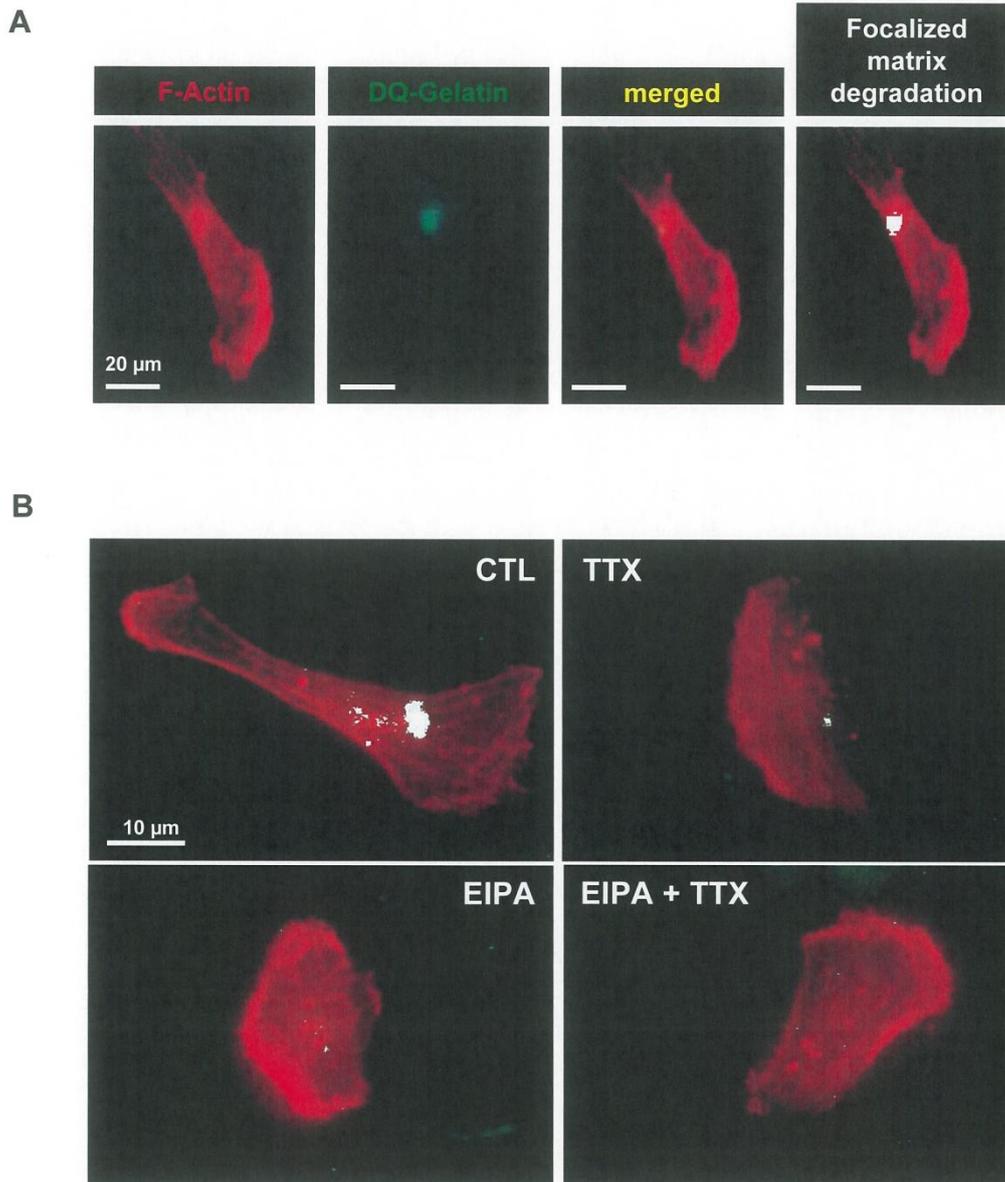
**Fig. S1. A**, Cells were grown for 24 h on a planar matrix of Matrigel™ containing DQ-Gelatin®. SIM imaging of invadopodia defined as being dense F-actin circular structures (red) co-localized with *in situ* matrix degradation (green). YZ and XZ projections from the selected area (white cross) show the insertion of this protrusive structure into the ECM. This figure represents Z-stage representations of XY plane sections taken from the ECM side (-Z) to the cell body. The 8 images shown are separated by 0.8 μm in the Z-dimension away from the matrix towards the cell. The invadopodium identified in an axial plan (XY) in figure 1B and showing a proteolytic spot (green) surrounded by F-actin structures is located below the cell body and is profoundly penetrating the ECM (> 5 μm depth). **B**, Representative photographs of immunofluorescent stainings performed on a MDA-MB-231 cancer cell grown on a Matrigel™-composed extracellular matrix and showing a strong co-localization between the protease Cathepsin B (CathB, green) and Na<sub>v</sub>1.5 channels (red) (Pearsons' r= 0.82). Since cells were permeabilized in order to immunodetect Na<sub>v</sub>1.5 channels, we can not discriminate between extracellular and intracellular cathepsins. However, as shown in figure 1E there is a strong cathepsin B activity in the extracellular milieu suggesting that these proteases could be addressed and released closely to membrane areas containing Na<sub>v</sub>1.5 channels. **C**, Split channels from Structured-Illumination Microscopy immunofluorescence experiments imaging showed in Figure 3A showing NHE-1 (green) and Na<sub>v</sub>1.5 (red) labelling performed on a MDA-MB-231 breast cancer cell grown on Matrigel™ and showing spots of strong co-localization (XY) corresponding to protrusive structures into the ECM. **D**, Split channels from confocal immunofluorescence experiments imaging showed in Figure 3B showing NHE-1 (green) and Na<sub>v</sub>1.5 (Blue) labelling performed on a MDA-MB-231 breast cancer cell grown on Matrigel™ and showing spots of strong co-localization in areas of matrix degradation (green) in a XY plane section. One area is selected (red rectangle) and is presented in a XZ projection, corresponding to protrusive structures into the ECM.



**Fig. S2.** Lentiviral transduction of wild-type MDA-MB-231 cells generated two stable cell lines: one expressing a shRNA targeting the expression of the *SCN5A* gene transcript (shNav<sub>v</sub>1.5), and one control cell line expressing a shRNA not targeting any known gene (shCTL). **A**, The efficacy of transduction was assessed by RT-qPCR on Nav<sub>v</sub>1.5 gene expression (n= 6 separate experiments, p<0.001). **B**, Representative sodium current ( $I_{Na}$ ) recorded for a depolarisation from -100 to -5 mV in shCTL and non-existent  $I_{Na}$  in shNav<sub>v</sub>1.5 cells. **C**, Mean  $\pm$  SEM  $I_{Na}$  current-voltage relationships constructed from 4 shCTL and 14 shNav<sub>v</sub>1.5 cells. **D**, Representative inward currents recorded for a depolarisation from -100 to -5 mV in one MDA-MB-231 shCTL cell in the lithium-containing external solution thus corresponding to a  $Li^+$  current ( $I_{Li}$ ).



**Fig. S3: A and B,** Prognostic analyses of gene expression in breast cancers - were performed using the software *Breast Cancer Gene-Expression Miner* (bc-GenExMiner v3.0; <http://bcgenex.centregauducheau.fr>) developed by the Integrated Center of Oncology René Gauducheau (Nantes-Saint Herblain, France), based on DNA microarrays results collected from published cohorts. Statistical tests were conducted on each of the individual cohorts and on pooled cohorts as described (Jezequel et al., 2012). Kaplan-Meier metastatic-relapse (MR)-free survival analyses were performed on data pooled from cohorts (see Methods) for the expression of **A.** cortactin (gene *CTTN*, n= 2566 patients) and **B.** cofilin (gene *CFL1*, n= 2314 patients). Cox results are displayed on the curve. **C.** In order to assess the cell survival, shCTL and shNav<sub>v</sub>1.5 cancer cells were seeded at  $1.5 \times 10^4$  cells per well in 24 well-plates in their respective culture medium in absence (CTL) or in presence of 30  $\mu$ M TTX (TTX). The cells were cultured for 24 hours and the quantities of living cells were determined using the tetrazolium salt assay as previously described (Gillet et al., 2009). The cell viability was expressed as formazan absorbance at 570 nm and expressed as a percentage of the control condition in the absence of TTX. Results were validated by manual cell counting. Three independent experiments were performed. Results were normalized to the control condition of each cell line and indicate that the TTX treatment, at the maximal duration used to assess cancer cell morphology and cortactin phosphorylation (Y421), had no effect on cell viability. **D-E,** MDA-MB-231 cancer cells were cultured for 24h in absence (CTL, vehicle) or in presence of 30  $\mu$ M TTX (TTX) or 10 nM anisomycin (Aniso) and the phosphorylation of p38 MAPK on Thr180/Tyr182 was analysed by western blot experiments using a mouse anti-Phospho Thr180/Tyr182 p38MAPK antibody (Cell Signalling, 1/1,000). HSC-70 was immunodetected using a primary mouse anti-HSC70 antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1/30,000). **D.** Representative western blot experiment showing that TTX (30  $\mu$ M) did not modify the level of phosphorylated p38 while anisomycin, known to strongly activate the stress-induced MAP kinases p38, increased it. **E.** Diagram showing the quantification of P-p38MAPK, normalized to HSC-70, in the treatment conditions used in D. N = 3 independent experiments. \*, p<0.05 as compared to CTL or to TTX condition. There is no statistical difference between CTL and TTX conditions. **E.** Representative western blot experiments showing that TTX (30  $\mu$ M) applied for 10 min or 24 hr did not modify the level of total phospho-tyrosine (Mouse Anti-Phospho-Tyrosine, Millipore, 4G10, 1/1,000), nor the level of phospho-EGFR1 (Y1068, mouse antibody, Cell Signaling, 1H12, 1/2,000). Therefore, TTX is not responsible for a general mechanism of dephosphorylation.



**Fig. S4: A**, The invadopodial activity in MDA-MB-231 cancer cells cultured on a Matrigel™-composed matrix containing DQ-Gelatin® was assessed and defined as being F-actin foci (red labelling, phalloidin-Alexa594) co-localised with focused proteolytic activities (green). Merging areas are represented as white pixels which are counted for every cell in order to calculate a “Matrix-Focalized-degradation activity index”. **B**, representative pictures of MDA-MB-231 cells untreated (CTL) or treated with 30 μM TTX or 1 μM EIPA or a combination of TTX + EIPA. Matrix degradation areas merging with F-actin foci appear as white pixels which were counted. Numbers of white pixels by cell in the different treatment conditions were measured then normalized to the number obtained in CTL condition.

#### References

Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G. and Le Guennec, J. Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* 284, 8680-91.

Jezequel, P., Campone, M., Gouraud, W., Guerin-Charbonnel, C., Leux, C., Ricolleau, G. and Campion, L. (2012). bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 131, 765-75.

### *C. Résumé de l'article*

Nous avons montré, par des études de microscopie de fluorescence et de fractionnement membranaire, que les protéines Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 sont retrouvées dans les fractions invadopodiales. Le canal Na<sub>v</sub>1.5 y est également colocalisé avec les cathepsines B qui sont associées à l'activité protéolytique des cellules. La co-immunoprécipitation du canal Na<sub>v</sub>1.5 avec l'échangeur NHE-1 et la cavéoline-1 révèle une grande proximité entre ces trois protéines dans les fractions enrichies en invadopodes des cellules MDA-MB-231. Les protéines Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 sont donc localisées dans des domaines membranaires spécialisés dans la dégradation et l'invasion de la matrice. De plus, l'étude de l'activité de l'échangeur NHE-1 en fonction du pH intracellulaire des cellules MDA-MB-231 montre que l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 augmente l'activité de l'échangeur NHE-1 par une modulation allostérique de l'affinité de l'échangeur pour les protons intracellulaires pour des pH intracellulaires (pHi) compris entre 6,4 et 7. La régulation allostérique de NHE-1 par Na<sub>v</sub>1.5 intervient donc dans des plateformes de signalisation hautement impliquées dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. L'augmentation de l'activité de NHE-1 par Na<sub>v</sub>1.5 dans les invadopodes favoriserait par conséquent la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau de ces zones spécialisées. Enfin, l'inhibition de l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 ou l'inhibition de son expression par un shRNA modifie la structure du cytosquelette d'actine puisqu'un traitement à la TTX augmente la circularité des cellules, diminue la phosphorylation de la cortactine et l'activité des kinases de la famille Src, impliquées dans la formation des invadopodes. Cette proximité dans les invadopodes permettrait une interaction fonctionnelle entre Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 ainsi qu'avec d'autres acteurs tels que la cavéoline-1 et la cortactine, conduisant conjointement à la formation et l'activité des invadopodes et à l'établissement d'un environnement périmembranaire acide, favorable à l'activité protéolytique des cellules cancéreuses.

### *D. Discussion*

Cette étude permet de mieux comprendre le mécanisme reliant l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 et le processus d'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines. Il est montré que l'activité des canaux sodiques participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine et potentialise la formation et l'activité des invadopodes qui sont spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire. En effet, l'inhibition de l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 ou de NHE-1 diminue la dégradation de la matrice extracellulaire associée à l'activité des invadopodes dans les cellules cancéreuses mammaires

humaines MDA-MB-231. Les invadopodes sont des structures extrêmement dynamiques (demi-vie d'environ une heure) et sont le siège de phénomène de polymérisation / dépolymérisation continue des filaments d'actine (Linder, 2009; Weaver, 2006). Plusieurs voies de signalisation sont favorables à la constitution des invadopodes, telles que les voies impliquant les kinases de la famille Src ou les GTPases telles que Cdc42 et Rac1 qui activent également des régulateurs de la polymérisation de l'actine comme le complexe Arp2/3, N-WASp (Wiskott Aldrich Syndrome Proteins), WAVE (WASp family verprolin homologous protein) (Yamaguchi H. et al. 2005 ; Pichot CS et al. 2010 ; Nakahara H et al. 2003). La cortactine et la cofiline peuvent également influencer la maturation des invadopodes (Linder, 2009; Oser and Condeelis, 2009; Oser et al., 2009).

La cofiline est une protéine nécessaire à la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine (Lappalainen and Drubin, 1997). Lorsqu'elle est non phosphorylée, la cortactine est associée à la cofiline. La phosphorylation de la cortactine, par des protéines de la famille des kinases Src, permet d'une part de dissocier le complexe que la cortactine réalise avec la cofiline et d'autre part favorise la polymérisation de l'actine en activant une GTPase, la Dynamine II (Oser et al., 2009). La cofiline seule, dissociée de la cortactine, se fixe aux filaments d'actine et favorise la formation de nouveaux branchements de filaments par le recrutement du complexe Arp2/3. La fixation du complexe Arp2/3 aux filaments d'actine est également sous la dépendance des protéines N-WASp et WAVE elles-mêmes dépendantes des GTPases Cdc42 et Rac1 (Oser et al., 2009). Dans notre étude, l'inhibition de l'activité des canaux sodiques par la TTX n'a pas d'effet sur l'expression et la phosphorylation de la cofiline (sur la sérine 3) mais diminue la quantité de cortactine phosphorylée (sur la tyrosine 421). La cortactine étant un substrat des kinases Src, nous avons étudié son activité et observé que la TTX, dès 5 minutes d'application, réduit l'activité des kinases Src. Cela suggère que l'activité des canaux  $Na_v1.5$  augmenterait l'activité des kinases Src ce qui favoriserait la phosphorylation de la cortactine (sur la tyrosine 421). Il existe deux autres sites de phosphorylation de la cortactine (sur les tyrosines 466 et 482) que nous n'avons pas recherchés dans notre étude. Celle sur la tyrosine 466 est activatrice et serait importante pour la formation des invadopodes. L'étude des effets de la TTX sur la phosphorylation de la tyrosine 421 pourrait donc être complétée avec l'étude de la phosphorylation de ces deux autres résidus. Il a récemment été montré que la phosphorylation de la cortactine régule le recrutement de NHE-1 dans les invadopodes. L'alcalinisation intracellulaire, induite par l'activité de NHE-1, permettrait également de dissocier le complexe cortactine-cofiline et ainsi induire la polymérisation de l'actine et la formation des invadopodes (Magalhaes et al., 2011). Dans notre modèle, l'activité des canaux  $Na_v1.5$  augmenterait la phosphorylation de la cortactine via les kinases Src. Cette augmentation de la phosphorylation de la cortactine d'une part permettrait le recrutement de NHE-1 à la membrane et d'autre part libérerait la cofiline et favoriserait la polymérisation de

l'actine. La dissociation du complexe cortactine-cofiline serait accentuée par l'activité de NHE-1 et influencerait directement la maturation et l'activité de dégradation des invadopodes. Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude en caractérisant l'implication de  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 dans le recrutement et l'activation des autres protéines intervenant dans le développement de nouveaux branchements et la polymérisation des filaments d'actine, telles que Arp2/3, N-WASp et WAVE, ainsi que leur régulateurs WIP (WASp Interacting Protein), TKS5 (substrat de la tyrosine kinase src) ou encore l'AFAP110 (actine filament-associated protein).

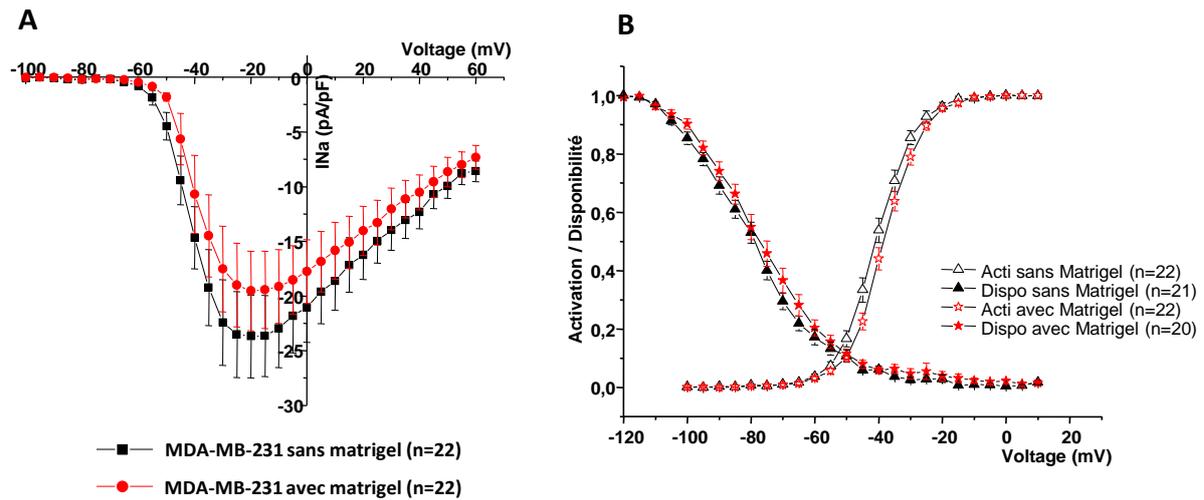
En présence d'un inhibiteur du canal  $\text{Na}_v1.5$ , les cellules MDA-MB-231 deviennent également plus circulaires, suggérant une modification du cytosquelette d'actine par l'activité du canal  $\text{Na}_v1.5$  (Figure 4). Cette modulation du cytosquelette d'actine pourrait impliquer un changement dans la régulation du complexe cortactine-cofiline.  $\text{Na}_v1.5$  est connu pour être lié au cytosquelette d'actine, via une interaction directe entre l' $\alpha$ -actinine-2 et la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV du canal (Ziane et al., 2010). En système d'expression (cellules TsA201), cette interaction directe entre l' $\alpha$ -actinine-2 et  $\text{Na}_v1.5$  augmente l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  à la membrane et donc la densité de courant, sans effet sur les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant (Ziane et al., 2010). L'hypothèse suivante peut alors être émise : l'activité de NHE-1, en alcalinisant le milieu intracellulaire et en augmentant la polymérisation de l'actine, favoriserait l'adressage de  $\text{Na}_v1.5$  au niveau des invadopodes. Chacune des deux protéines  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1, indépendamment l'une de l'autre, semble donc jouer un rôle sur la polymérisation de l'actine et pourrait donc former des sites membranaires favorables à l'initiation des invadopodes. De plus,  $\text{Na}_v1.5$  semble importante pour le recrutement membranaire de NHE-1 au niveau des invadopodes et inversement NHE-1 semble importante pour l'adressage membranaire de  $\text{Na}_v1.5$  au niveau des invadopodes.

Il a été décrit dans des macrophages une régulation par  $\text{Na}_v1.5$  de l'acidification et du transport de vésicules intracellulaires vers les podosomes qui sont des domaines cellulaires similaires aux invadopodes (Artym et al., 2011; Carrithers et al., 2007). Les invadopodes sont situés à proximité de l'appareil de Golgi, suggérant que le transport de vésicules vers les invadopodes pourrait être nécessaire à leur formation ou à leur fonction (Baldassarre et al., 2003).  $\text{Na}_v1.5$  pourrait donc stimuler le transport vésiculaire et le recrutement de protéines, indispensables à la constitution et à l'activité invadopodiale, vers les sites de formation des invadopodes des cellules MDA-MB-231.

La co-immunoprécipitation de  $\text{Na}_v1.5$ , NHE-1 et de la cavéoline-1 indique une très forte proximité entre ces trois protéines mais n'éclaircit pas la nature de leurs interactions (directe ou indirecte). Il a été démontré que les radeaux lipidiques riches en cavéoline-1 étaient nécessaires à la formation des invadopodes et à leur activité de dégradation (Caldieri et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009). Les

radeaux lipidiques sont des zones membranaires riches en sphingolipides et en cholestérol connues pour être des plateformes de signalisation contenant de nombreuses protéines membranaires et de signalisation (Helms and Zurzolo, 2004; Pike, 2003), dont des acteurs privilégiés pour la polymérisation de l'actine tels que WASP et Arp2/3 (Golub and Pico, 2005; Rozelle et al., 2000). Nous avons montré que les protéines NHE-1 et Na<sub>v</sub>1.5 sont colocalisées dans les domaines membranaires riches en cavéoline-1 (Brisson et al., 2011) dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231. Nous pouvons nous demander si cette proximité entre ces trois protéines est nécessaire à la régulation de NHE-1 par Na<sub>v</sub>1.5 et si la cavéoline-1 pourrait jouer un rôle dans cette interaction fonctionnelle. Dans les invadopodes, la cavéoline-1 pourrait être nécessaire pour le recrutement de Na<sub>v</sub>1.5 et de NHE-1 et pourrait également établir le lien fonctionnel en interagissant directement avec les deux protéines. Il a été montré que la cavéoline-1 était essentielle pour l'activation de Rac1 (Zuo et al., 2005) et que Rac1, en se liant à la cavéoline-1, favorisait l'accumulation de la cavéoline-1 aux sites d'adhésion cellulaire (Nethe et al., 2010). Une étude récente décrit également une interaction directe entre la cavéoline-1 et les kinases Src (Rathor et al., 2014). La cavéoline-1 pourrait donc servir de protéine d'échafaudage pour Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 ainsi que pour les kinases Src, conduisant à l'activation de Rac1 et de la voie Arp2/3. Pour étudier l'implication de la cavéoline-1, nous pourrions inhiber son expression par extinction moléculaire à l'aide de siARN et étudier dans un premier temps l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 (patch clamp et mesure d'efflux de protons respectivement) ainsi que leur interaction (par immunoprécipitation). Dans un second temps nous pourrions étudier l'activité protéolytique des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (par la technique de dégradation de la DQ-gélatine). Enfin, il serait intéressant d'analyser la polymérisation des filaments d'actine en quantifiant l'actine-F dans chaque condition par microscopie de fluorescence.

La culture des cellules cancéreuses MDA-MB-231 sur une matrice est indispensable pour évaluer la formation et l'activité des invadopodes dans ces cellules. C'est pourquoi les études de localisation membranaire des protéines Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 dans les invadopodes, par immunomarquage ou par fractionnement membranaire, ont été réalisées sur des cellulesensemencées sur une matrice (Matrigel ou DQ-gélatine). Une étude précédente a montré que l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 n'était pas modifiée lorsque l'on inhibait l'activité de l'échangeur NHE-1 avec de l'EIPA (inhibiteur spécifiques des échangeurs NHE), alors que l'activité de NHE-1 était en partie régulée par l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 (Brisson et al., 2011). Cependant, les études électrophysiologiques de l'activité des canaux sodiques ont été réalisées sur des cellules adhérentes sans matrice. Nous avons voulu savoir si la culture des cellules MDA-MB-231 sur une matrice de Matrigel influençait l'activité des canaux sodiques Na<sub>v</sub>1.5 (figure 24).



**Figure 24 :** Effet de la culture des cellules MDA-MB-231 sur une matrice de Matrigel sur le courant sodique  $Na_v1.5$ .

Courant sodique macroscopique des cellules MDA-MB-231 enregistré en configuration cellule entière (whole-cell). A/ relation courant-voltage ( $I_{Na}$ -V). B/ Relation activation-voltage et disponibilité-voltage. Dispo : disponibilité ; Acti : activation ; n : nombre de cellules étudiées.

Cette analyse électrophysiologique nous a permis de constater qu'il n'y a pas de différence significative de densité de courant macroscopique dans les deux conditions de culture (avec ou sans Matrigel). Il n'y a pas non plus de différence de disponibilité entre les canaux sodiques des cellules cultivées sans matrice et ceux des cellules cultivées sur Matrigel (les voltages de demi-disponibilité sont de  $-81,5 \pm 1,5$  mV et de  $-77,3 \pm 2$  mV respectivement). On observe néanmoins un décalage significatif de la courbe d'activation vers des potentiels plus positifs (les voltages de demi-activation sont de  $-40,7 \pm 1,1$  mV et de  $-38,0 \pm 0,7$  mV respectivement ; test de Mann-Whitney  $p=0,042$ ). Cependant, le courant de fenêtre, responsable d'une entrée continue de sodium au potentiel de membrane des cellules en culture, ne semble pas modifié. Dans ces conditions de culture, la présence d'une matrice ne semble pas modifier l'activité globale des canaux  $Na_v1.5$ . Il serait cependant intéressant de savoir si les canaux  $Na_v1.5$ , qui semblent être adressés préférentiellement dans les invadopodes, ont une activité différente dans les invadopodes par rapport à ceux exprimés en dehors, dans les autres parties membranaires. Nous pourrions également envisager des études par microspectrofluorimétrie, avec une sonde fluorescente sensible au sodium (SBFI-AM), sur des cellules adhérant à une matrice pour induire la formation d'invadopodes. Ainsi, les zones de variations de sodium intracellulaire pourraient être corrélées à des marqueurs protéiques structuraux et/ou fonctionnels des invadopodes. Cette même approche par microspectrofluorimétrie pourrait également être utilisée pour la mesure de l'activité de l'échangeur NHE-1 (sonde BCECF-AM).

Une équipe s'est également intéressée à la culture en trois dimensions *in vitro* des cellules MDA-MB-231 et aux effets des paramètres environnementaux (hypoxie, densité cellulaire, acidité extracellulaire) sur la formation des invadopodes (Lee Mi-Sook et al. 2014). Cette étude révèle, lorsque les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans une matrice en trois dimensions de collagène I, une diminution de la voie c-jun-N-terminal-kinase (JNK), une activation de la voie TGFβ1/smad, une induction de l'expression de SNAIL1 (facteur répresseur de la transcription, impliqué la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du sein ; Davidson NE et al. 2005) et une diminution de l'expression de la cortactine. Cependant, ces effets ne sont pas retrouvés lorsque les cellules MDA-MB-231 sontensemencées dans du Matrigel ou dans un mélange Matrigel-Collagène I (Lee et al., 2014). Ceci soulève donc le problème du choix des différentes matrices utilisées pour la culture des cellules cancéreuses en deux ou trois dimensions. En effet, en fonction des signaux extracellulaires (protéines formant la matrice utilisée), une voie de signalisation particulière pourrait être activée via des intégrines différentes.

Cette étude permet de proposer un mécanisme de régulation de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires hautement invasives. Na<sub>v</sub> apparaît comme une protéine centrale dans ce mécanisme avec un rôle dans la formation de structures spécifiques de la dégradation de matrice ainsi que dans leur activité protéolytique. De plus, un lien fonctionnel entre l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 et l'activité de l'échangeur NHE-1 au sein des invadopodes a été établi. L'activité de Na<sub>v</sub>1.5 n'est pas modifiée lorsque l'on inhibe l'activité de l'échangeur NHE-1 avec de l'EIPA, alors que l'activité de NHE-1 est en partie régulée par l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 (Brisson et al., 2011). Il semble donc important de déterminer les mécanismes permettant à l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 de réguler la sensibilité de NHE-1 aux protons intracellulaires. Les auteurs proposent un changement de conformation de NHE-1, sous l'influence de facteurs de croissance, qui augmenterait son affinité pour les protons intracellulaires (Lacroix et al., 2004). Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, un changement de conformation du canal Na<sub>v</sub>1.5 lors de son activation pourrait directement influencer la conformation et donc l'affinité de NHE-1 pour les protons intracellulaires. L'environnement lipidique des cavéoles pourrait également être un facteur influençant ce changement de conformation. L'implication d'intermédiaires tels que des protéines d'interaction (la cavéoline-1, les kinases Src, les sous-unités auxiliaires β des canaux Na<sub>v</sub>, etc.) ou des protéines de signalisation (les petites protéines G) activées par l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 pourrait également expliquer la régulation allostérique de NHE-1. Enfin, l'existence de kinases inductibles par le sel (salt-inducible kinases, SIK) pourrait rendre compte de l'importance du sodium intracellulaire (Doi et al., 2002; Wang et al., 1999). L'expression de cette kinase sensible au sodium dans les cellules MDA-MB-231 pourrait également établir le lien fonctionnel entre Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1. En effet, l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 augmente la concentration

intracellulaire de sodium qui pourrait activer les SIK et catalyserait la phosphorylation de l'échangeur NHE-1 ce qui augmenterait sa sensibilité pour les protons intracellulaires. Ces hypothèses devront être étudiées.

Les canaux  $\text{Na}_v$  semblent donc être une cible potentielle intéressante pour le traitement du cancer du sein et la prévention de la formation des métastases. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au rôle de  $\text{Na}_v1.5$  et à l'effet de son inhibition pharmacologique dans le développement tumoral et la formation de métastases *in vivo* sur un modèle murin.

## II. La ranolazine inhibe l'invasivité cellulaire et la colonisation pulmonaire induite par l'activité de $\text{Na}_v1.5$

---

### A. Introduction

Le développement de métastases est corrélé au potentiel invasif des cellules cancéreuses. L'invasivité des cellules est liée à leur capacité à dégrader et à envahir les matrices extracellulaires. Nous avons vu précédemment que le canal sodique  $\text{Na}_v1.5$  est exprimé et fonctionnel dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Son activité participe à la formation et l'activité des invadopodes qui sont des protrusions membranaires impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire des cellules cancéreuses. Au sein des invadopodes, l'entrée continue de sodium due au courant de fenêtre pourrait favoriser l'activité de l'échangeur NHE-1 par une augmentation de sa sensibilité aux protons (effet allostérique) entraînant alors une augmentation de l'efflux de protons qui est favorable à l'activité de protéases acides et à l'invasion de la matrice extracellulaire. De plus, l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  contrôle en partie la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la formation des invadopodes.  $\text{Na}_v1.5$  contrôle également la polymérisation des filaments d'actine via l'augmentation de l'activité des kinases Src et la phosphorylation de la cortactine.

L'inhibition du courant sodique par la TTX diminue l'invasivité cellulaire *in vitro* (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). La ranolazine est un agent antiarythmique et antiangoreux dont l'utilisation a été approuvée en 2006 aux Etats-unis par la Food and Drug Administration (FDA), pour le traitement des patients atteints d'angine de poitrine. La ranolazine diminue de 30 % le courant sodique de pic mais inhibe de façon spécifique le courant sodique persistant ( $\text{IC}_{50}$  : 5,9  $\mu\text{mol/L}$ ) (Antzelevitch et al., 2004).

Dans cette étude nous avons voulu déterminer le rôle des canaux sodiques  $\text{Na}_v1.5$  des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, dans la colonisation métastatique des organes chez la souris immunodéprimée (NMRI nude). L'utilisation pharmacologique de la TTX *in vivo* n'étant pas envisageable (elle bloquerait également les activités cardiaque et nerveuse), nous avons voulu caractériser l'effet de la ranolazine sur le courant sodique ainsi que sur l'invasivité cellulaire *in vitro* et *in vivo*.

*B. Article*

**Ranolazine inhibits Na<sub>v</sub>1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization**

DRIFFORT V., GILLET L., BON E., MARIONNEAU-LAMBOT S., OULLIER T., JOULIN V., COLLIN C., PAGES J.C., JOURDAN M.L., CHEVALIER S., BOUGNOUX P., LE GUENNEC J.Y., BESSON P. & ROGER S.

**Title page**

**RANOLAZINE INHIBITS Na<sub>v</sub>1.5-MEDIATED BREAST CANCER CELL INVASIVENESS AND LUNG COLONIZATION**

Virginie DRIFFORT<sup>1</sup>, Ludovic GILLET<sup>1</sup>, Emeline BON<sup>1</sup>, Séverine MARIONNEAU-LAMBOT<sup>2</sup>, Thibault OULLIER<sup>2</sup>, Virginie JOULIN<sup>3</sup>, Christine COLLIN<sup>4</sup>, Jean-Christophe PAGÈS<sup>4,5</sup>, Marie-Lise JOURDAN<sup>1,4</sup>, Stéphan CHEVALIER<sup>1,6</sup>, Philippe BOUGNOUX<sup>1,4</sup>, Jean-Yves LE GUENNEC<sup>7</sup>, Pierre BESSON<sup>1,6§</sup> & Sébastien ROGER<sup>1,8§</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, France

<sup>2</sup> Cancéropôle du Grand Ouest, Nantes, France

<sup>3</sup> Inserm U1009; Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>4</sup> CHRU de Tours, France

<sup>5</sup> Inserm, U966; Université François-Rabelais de Tours, France

<sup>6</sup> UFR Sciences Pharmaceutiques, Université François-Rabelais de Tours, France

<sup>7</sup> Inserm U1046; Université de Montpellier-1; Université de Montpellier-2, France

<sup>8</sup> UFR Sciences et Techniques, Département de Physiologie Animale, Université François-Rabelais de Tours, France

§, these two authors contributed equally as last authors

Correspondence should be addressed to:

Dr. Sébastien Roger, Inserm UMR1069, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France, Tel: (+33) 2 47 36 61 30, Fax: (+33) 2 47 36 62 26, Email: sebastien.roger@univ-tours.fr

Or to

Dr. Pierre Besson, Inserm UMR1069, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France, Tel: (+33) 2 47 36 60 63, Fax: (+33) 2 47 36 62 26, Email: pierre.besson@univ-tours.fr

**Running head:** Ranolazine reduces breast cancer invasiveness

**Number of words:** 1,485

## **Abstract**

**Background:** Na<sub>v</sub>1.5 voltage-gated sodium channels are abnormally expressed in breast tumours and their expression level is associated with metastatic occurrence and patients' death. In breast cancer cells, Na<sub>v</sub>1.5 activity promotes the proteolytic degradation of the extracellular matrix and enhances cell invasiveness.

**Findings:** In this study, we showed that the extinction of Na<sub>v</sub>1.5 expression in human breast cancer cells almost completely abrogated lung colonisation in immunodepressed mice (NMRI nude). Furthermore, we demonstrated that ranolazine (50 µM) inhibited Na<sub>v</sub>1.5 currents in breast cancer cells and reduced Na<sub>v</sub>1.5-related cancer cell invasiveness *in vitro*. *In vivo*, the injection of ranolazine (50 mg/kg/day) significantly reduced lung colonisation by Na<sub>v</sub>1.5-expressing human breast cancer cells.

**Conclusions:** Taken together, our results demonstrate the importance of Na<sub>v</sub>1.5 in the metastatic colonisation of organs by breast cancer cells and indicate that small molecules interfering with Na<sub>v</sub> activity, such as ranolazine, may represent powerful pharmacological tools to inhibit metastatic development and improve cancer treatments.

**Key words:** Na<sub>v</sub>1.5 voltage-gated sodium channels, cancer cell invasiveness, ranolazine, metastases

## Findings

Breast cancer is the primary cause of death by cancer in women worldwide and patients mostly die because of metastases appearance and development<sup>1</sup> which rely in part on the ability of cancer cells to degrade and migrate through extracellular matrices (ECM). Currently, there is no treatment for specifically inhibiting metastases development. Voltage-gated sodium channels ( $\text{Na}_v$ ) are essential for action potential firing and as such are characteristic of excitable cells<sup>2</sup>. However, different  $\text{Na}_v$  isoforms have been found in non-excitabile epithelial human cancer biopsies and cells, such as in breast<sup>3,4</sup>, lung<sup>5-7</sup>, prostate<sup>8</sup>, cervix<sup>9</sup>, ovarian<sup>10,11</sup> and colon cancer<sup>12</sup>, and their function, through persistent currents at the membrane potential, enhances degradation of ECM<sup>5, 13-15</sup>. Notably, the  $\text{Na}_v1.5$  isoform is abnormally expressed in breast cancer biopsies, while it is not in non-cancerous mammary tissues<sup>14</sup>, and its level of expression is associated with lymph node invasion, the development of metastases and a reduced survival of patients<sup>3,16,17</sup>. In cancer cells, it is expressed as a neonatal splice variant showing a 7-amino acid substitution in the segments S3 and S4 of the domain I (DI-S3-S4) of the protein compared to the adult variant, that shows a particular pharmacology<sup>18</sup> and was proposed to serve as a metastatic marker<sup>16</sup>.  $\text{Na}_v1.5$  is functional at the plasma membrane of highly invasive breast cancer cells<sup>3, 16, 17</sup>, and its activity maintains a pro-invasive phenotype<sup>15</sup>, related to “mesenchymal migration”<sup>19</sup>. Indeed, while the complete mechanism involved is not yet elucidated,  $\text{Na}_v1.5$  activity was shown *i)* to control Src kinase activity, cortactin phosphorylation (Y421) and the subsequent polymerisation of actin filaments, *ii)* to increase the activity of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger type 1 (NHE-1), thus enhancing the efflux of protons and the proteolytic activity of extracellularly-released acidic cysteine cathepsins B and S<sup>13, 20</sup>. Altogether, these results indicated that  $\text{Na}_v1.5$  promotes the invadopodial activity of breast cancer cells and the invasion of the surrounding ECM<sup>15</sup>. Molecules reducing its activity, such as tetrodotoxin, reduce cancer cell invasiveness *in vitro*<sup>3, 14, 18</sup>. Correlatively, molecules that increase its activity, such as veratridine, enhance ECM invasion<sup>13</sup>. However, to the best of our knowledge, the importance of  $\text{Na}_v1.5$  expression, and the relevance for its pharmacological inhibition, on the metastatic organ colonisation by breast cancer cells have never been reported so far. Ranolazine is an antiarrhythmic drug indicated for the treatment of chronic angina that was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2006. While it is proposed to have several pharmacological actions, its best characterized one is the selective inhibition of late sodium currents<sup>21</sup> thus reducing calcium overload through  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) and improving ventricular relaxation in pathological conditions associated with cardiac ischemia<sup>22</sup>. In this study we investigated how  $\text{Na}_v1.5$  expression in human breast cancer cells affected metastatic colonisation of organs in immunodepressed mice, and whether its pharmacological inhibition by ranolazine reduced cancer cell invasiveness both *in vitro* and *in vivo*.

Highly invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells express  $\text{Na}_v1.5$  channels giving rise to transient inward sodium currents (INa) under voltage-clamp procedures<sup>13</sup> (see supplementary file 1 for Material and Methods). INa-voltage (INa-V) protocols were performed using the whole-cell configuration of the patch clamp technique from MDA-MB-231-Luc cells modified to stably express a null-target small hairpin RNA (shCTL). The INa-V relationship, obtained from a holding potential of -100 mV, indicated a threshold of activation around -60 mV and maximal current of  $-12.1 \pm 2.2$  pA/pF at a voltage of -10 mV (Fig. 1A). The acute application of ranolazine (50  $\mu\text{M}$ ) significantly reduced the maximal amplitude to  $-8.7 \pm 1.7$  pA/pF ( $p < 0.001$ ). This decrease in the maximal current amplitude was associated with a significant leftward shift of the availability-voltage relationship (Fig. 1B). The half (1/2)-inactivation voltage was shifted from  $-84.1 \pm 1.4$  mV to  $-90.3 \pm 1.7$  mV ( $p < 0.001$ ) in absence and presence of ranolazine, respectively. The activation-voltage relationship was significantly modified (Fig. 1C), and the 1/2-activation voltage was shifted from  $-37.1 \pm 1.0$  mV to  $-39.2 \pm 0.6$  mV ( $p < 0.01$ ). Therefore, ranolazine reduced efficiently the activity of the neonatal  $\text{Na}_v1.5$  isoform expressed in human breast cancer cells. This isoform is the only one to be functional in breast cancer cells<sup>13, 16</sup> and we selected cells stably expressing a small hairpin RNA targeting its expression (sh $\text{Na}_v1.5$ ) after lentiviral transduction. This led to a significant  $89 \pm 1\%$  decrease of  $\text{Na}_v1.5$  mRNA expression (Fig. 2A), resulting in the almost complete disappearance of sodium currents (Fig. 2B), with no effect on cell viability (Fig. 2C). Before assessing the effect of ranolazine in reducing cancer cell invasiveness, we addressed a possible cytotoxic effect of its application. Figure 2D indicates that ranolazine, incubated for 5 days in a range of concentration from 0.1 to 100  $\mu\text{M}$  had no effect on cell viability. It was then used at 50  $\mu\text{M}$  in the 24h invasion experiment with Matrigel<sup>TM</sup>-coated filters (Fig. 2E). In shCTL cells, cell invasiveness was reduced by  $35 \pm 4\%$  with the total inhibition of  $\text{Na}_v1.5$  currents with 30  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX), and by  $18 \pm 3\%$  with ranolazine. In comparison to shCTL cells, sh $\text{Na}_v1.5$  cancer cells, which do not express  $\text{Na}_v1.5$ , had a reduced invasiveness of  $33 \pm 10\%$ . In sh $\text{Na}_v1.5$  cells, both TTX and ranolazine were ineffective to further reduce cell invasiveness, suggesting that ranolazine was specific in inhibiting  $\text{Na}_v1.5$ -related invasion.  $\text{Na}_v1.5$  expression and activity was recently shown to control the acquisition of a pro-invasive phenotype, by maintaining a spindle-shape morphology and by controlling the ECM proteolysis by MDA-MB-231 cancer cells<sup>15</sup>. We found that ranolazine increased the circularity of shCTL cells, thus decreasing the pro-invasive morphology, to the same extent as the complete extinction of  $\text{Na}_v1.5$  expression (Fig. 2F). Furthermore, ranolazine reduced the focal ECM degradative activity of shCTL cells by  $58.6 \pm 10.0\%$  (Fig. 2G). This activity, which is related to the invadopodial activity, was monitored as being the release of fluorescence from DQ-gelatin at focal sites of F-actin polymerisation as previously described<sup>15</sup>.

Because  $\text{Na}_v1.5$  was proposed to promote metastases development from breast tumours, we assessed the importance of its expression in human breast cancer cells for the colonisation of organs. ShCTL or sh $\text{Na}_v1.5$  cells, both expressing the luciferase gene, were injected in the tail vein of NMRI nude mice. A third experimental group was set with mice injected with shCTL cells and receiving a daily intraperitoneal injection of ranolazine (50 mg/Kg – 5 days per week). The colonisation of mice organs by human cancer cells was followed *in vivo*, every week for a total duration of 8 weeks, by bioluminescent imaging (BLI) after luciferin injection (Fig. 3A). There was no statistical difference in the evolution of animal body weights between the three groups (Fig. 3B). BLI performed in living animals indicated that shCTL cells, which express  $\text{Na}_v1.5$ , strongly colonised and developed into the chest area (which was the case for 17 out of 18 mice). In contrast, sh $\text{Na}_v1.5$  cells led to a very weak signal (1/12 mice) or no signal at all (11/12 mice) in the chest area. Ranolazine, which inhibited  $\text{Na}_v1.5$  currents (Fig. 1), significantly reduced total BLI signal in mice injected with shCTL cells. In this experimental group, BLI signal was recorded in 5 out of 8 mice (Fig. 3C). At completion of the study, mice were sacrificed and isolated organs (lungs, brain, liver, bones from rachis/ribs and legs) were analysed *ex vivo*. In the shCTL group, all mice showed lung colonisation (18/18) and a small proportion also had bioluminescent signal in rachis and ribs (2/18) and in leg bones (2/18). In the sh $\text{Na}_v1.5$  group, 7 mice out of 12 had lung colonisation and one (1/12) had bioluminescent signal in rachis and ribs. In the ranolazine group, although 8/8 mice presented lung colonisation, bioluminescence was dramatically reduced by  $77\pm 8\%$ , at a level similar to the experimental suppression of  $\text{Na}_v1.5$  (inhibition of lung BLI by  $97\pm 2\%$ ) (Fig. 3D, 3E).

While it is now well-established that  $\text{Na}_v$  channels are anomalously expressed in several epithelial tumours and are associated with metastasis occurrence and patients mortality<sup>12, 16, 17, 23</sup>, the consequence of their expression on metastatic organ colonisation was not demonstrated so far. To our knowledge, this study is the first to clearly establish a link between  $\text{Na}_v1.5$  expression in human breast cancer cell and the colonisation of lungs *in vivo*. Furthermore, this study using ranolazine, a drug that is clinically used, shows that the pharmacological inhibition of  $\text{Na}_v$  channels could be effective in reducing metastatic colonisation with no apparent toxic effect. In conclusion, this study opens a new therapeutical concept for the management of cancer disease. Inhibitors of  $\text{Na}_v$  channels, already approved for other clinical use such as antiarrhythmics, anticonvulsants<sup>17</sup> or anaesthetics<sup>24</sup>, or new molecules that are even more effective in blocking neonatal variants, could be of high interest in the prevention and/or reduction of metastatic spreading of cancer cells at the diagnosis of the primary tumour.

**List of abbreviations**

BLI, Bioluminescent imaging ; ECM, Extracellular matrix ;  $I_{Na}$  , sodium currents ;  $Na_v$  , voltage-gated sodium channels ; TTX, tetrodotoxin

**Competing interest**

Authors declare that they have no competing interest.

**Author contributions**

V.D., L.G. and E.B. performed *in vitro* experiments. V.D., S. M.-L. and T.O. performed *in vivo* experiments. V.D., C.C., V.J., J.-C.P. and M.-L.J. designed, produced shRNA, and participated to the selection of cell lines, S.C., P.B, and J.-Y.L.G contributed to the design of the study. Data were conceived, analyzed and interpreted by V.D., P.B. and S.R. Overall supervision of the study was performed by P.B. and S.R. Paper was written by P.B. and S.R., read and corrected by all authors.

**Acknowledgements**

This work was supported by "Ministère de la Recherche et des Technologies", Inserm, "Ligue Nationale Contre le Cancer", Région Centre (grant "Na<sub>v</sub>Metarget" and LIPIDS project of ARD2020-Biomedicaments) and "Association CANCECEN". We thank I. Domingo and C. Le Roy for technical and administrative assistance. We thank Prof. W.J. Brouillette (University of Alabama, USA) for helpful comments about the manuscript.

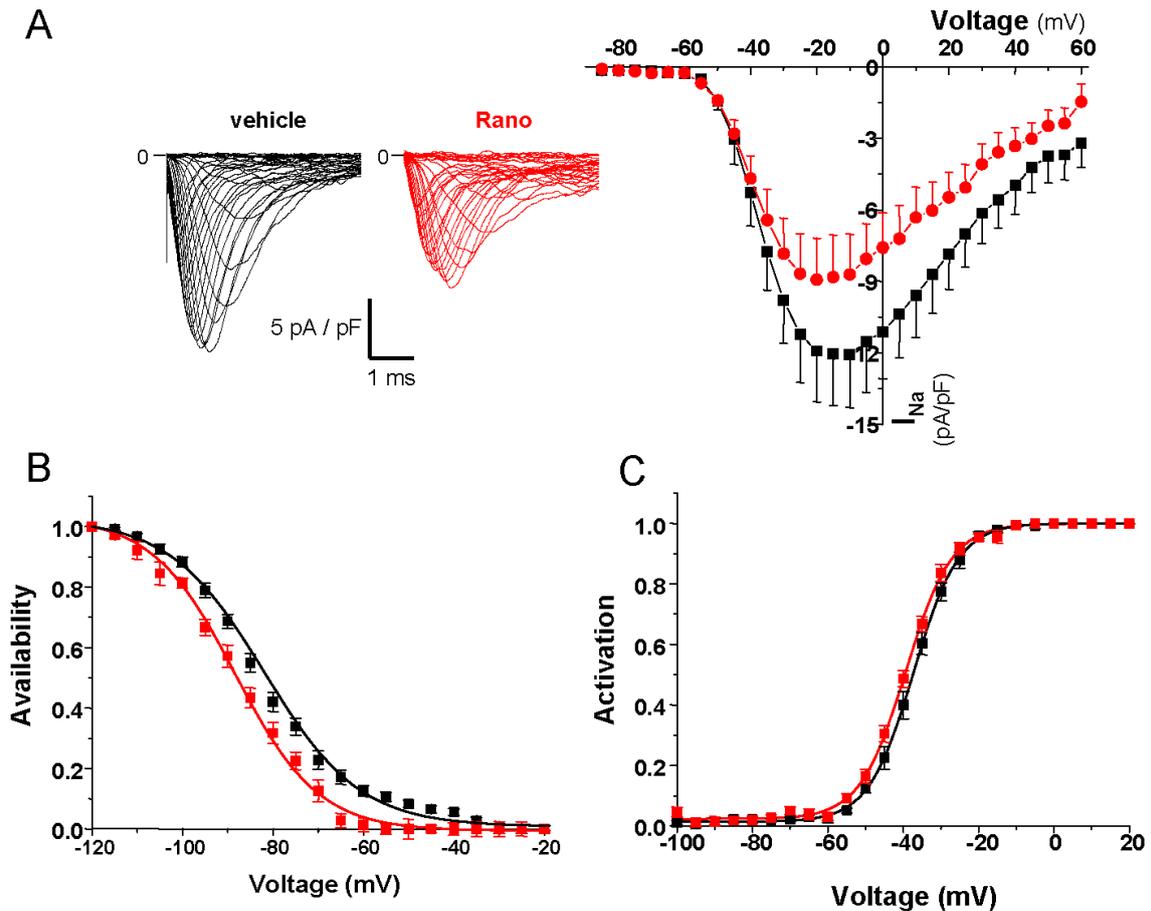
## References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Catterall WA. Voltage-Gated Sodium Channels at 60:Structure, Function, and Pathophysiology. *J Physiol* 2012.
3. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 2003;1616:107-11.
4. Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JK, Djamgoz MB. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates *in vitro* invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101:149-60.
5. Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Iochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:774-86.
6. Pancrazio JJ, Viglione MP, Tabbara IA, Kim YI. Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1989;49:5901-6.
7. Onganer PU, Djamgoz MB. Small-cell Lung Cancer (Human): Potentiation of Endocytic Membrane Activity by Voltage-gated Na(+) Channel Expression *in vitro*. *J Membr Biol* 2005;204:67-75.
8. Diss JK, Stewart D, Pani F, Foster CS, Walker MM, Patel A, Djamgoz MB. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression *in vivo*. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005.
9. Hernandez-Plata E, Ortiz CS, Marquina-Castillo B, Medina-Martinez I, Alfaro A, Berumen J, Rivera M, Gomora JC. Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *Int J Cancer* 2012;130:2013-23.
10. Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M, Wang Z. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 2010;23:1293-9.
11. Frede J, Fraser SP, Oskay-Ozcelik G, Hong Y, Ioana Braicu E, Sehouli J, Gabra H, Djamgoz MB. Ovarian cancer: Ion channel and aquaporin expression as novel targets of clinical potential. *Eur J Cancer* 2013;49:2331-44.
12. House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM, Lee NH. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 2010;70:6957-67.

13. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bognoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* 2009;284:8680-91.
14. Roger S, Potier M, Vandier C, Besson P, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr Pharm Des* 2006;12:3681-95.
15. Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S, Reshkin SJ, Gore J, et al. NaV1.5 Na<sup>+</sup> channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* 2013;126:4835-42.
16. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, Pani F, Siwy Z, Krasowska M, Grzywna Z, Brackenbury WJ, Theodorou D, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005;11:5381-9.
17. Yang M, Kozminski DJ, Wold LA, Modak R, Calhoun JD, Isom LL, Brackenbury WJ. Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012.
18. Roger S, Guennec JY, Besson P. Particular sensitivity to calcium channel blockers of the fast inward voltage-dependent sodium current involved in the invasive properties of a metastatic breast cancer cell line. *Br J Pharmacol* 2004;141:610-5.
19. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011;147:992-1009.
20. Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S, Gore J. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene* 2011;30:2070-6.
21. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 2004;110:904-10.
22. Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:1031-8.
23. Diaz D, Delgadillo DM, Hernandez-Gallegos E, Ramirez-Dominguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS, Berumen J, Camacho J, Gomora JC. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* 2007;210:469-78.
24. Baptista-Hon DT, Robertson FM, Robertson GB, Owen SJ, Rogers GW, Lydon EL, Lee NH, Hales TG. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and NaV1.5 channel function. *Br J Anaesth* 2014.

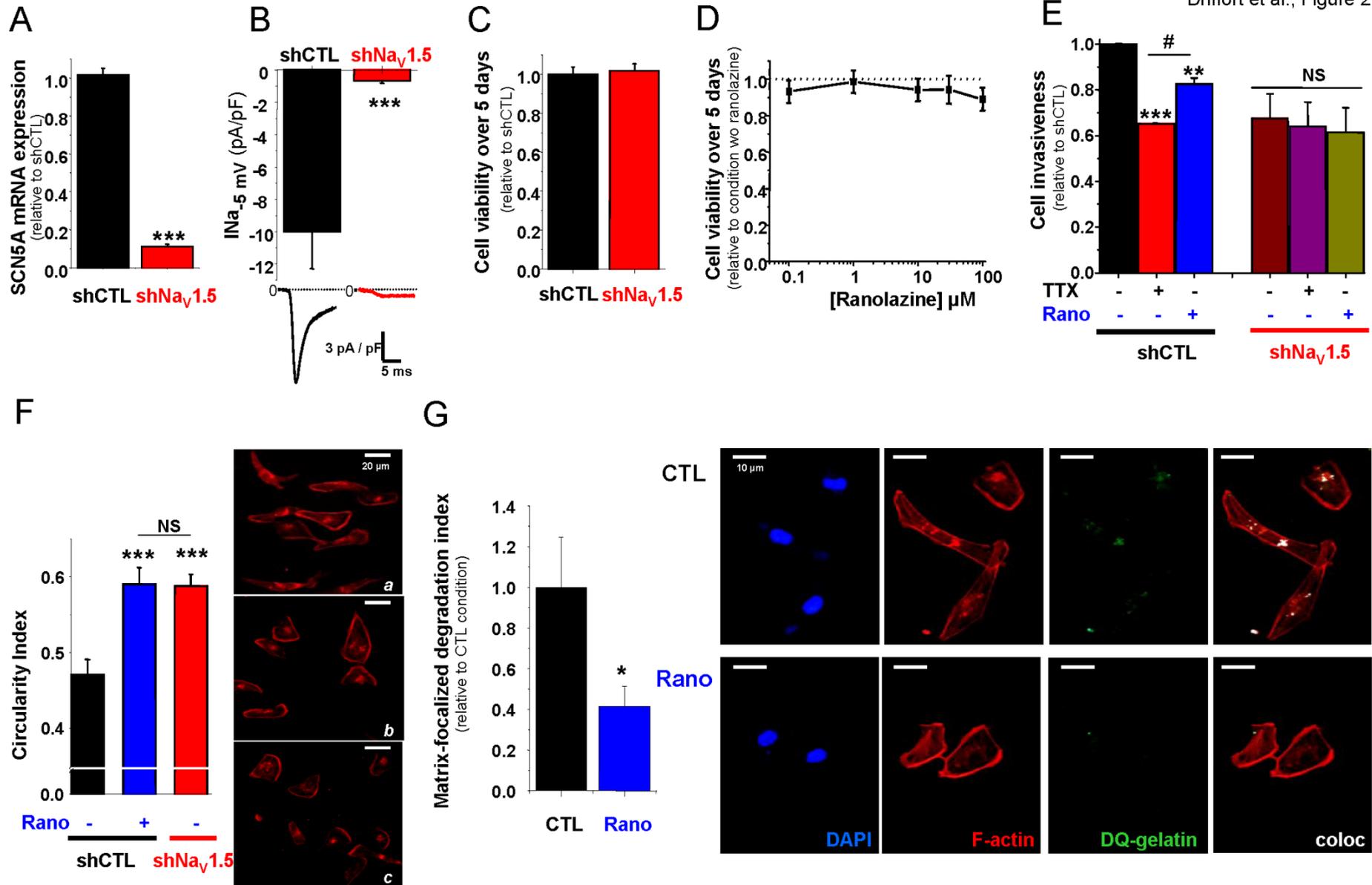
25. Jelassi B, Chantome A, Alcaraz-Perez F, Baroja-Mazo A, Cayuela ML, Pelegrin P, Surprenant A, Roger S. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene* 2011;30:2108-22.

## Figures plus figure legends



**Figure 1: Ranolazine inhibits sodium current in human breast cancer cells.**

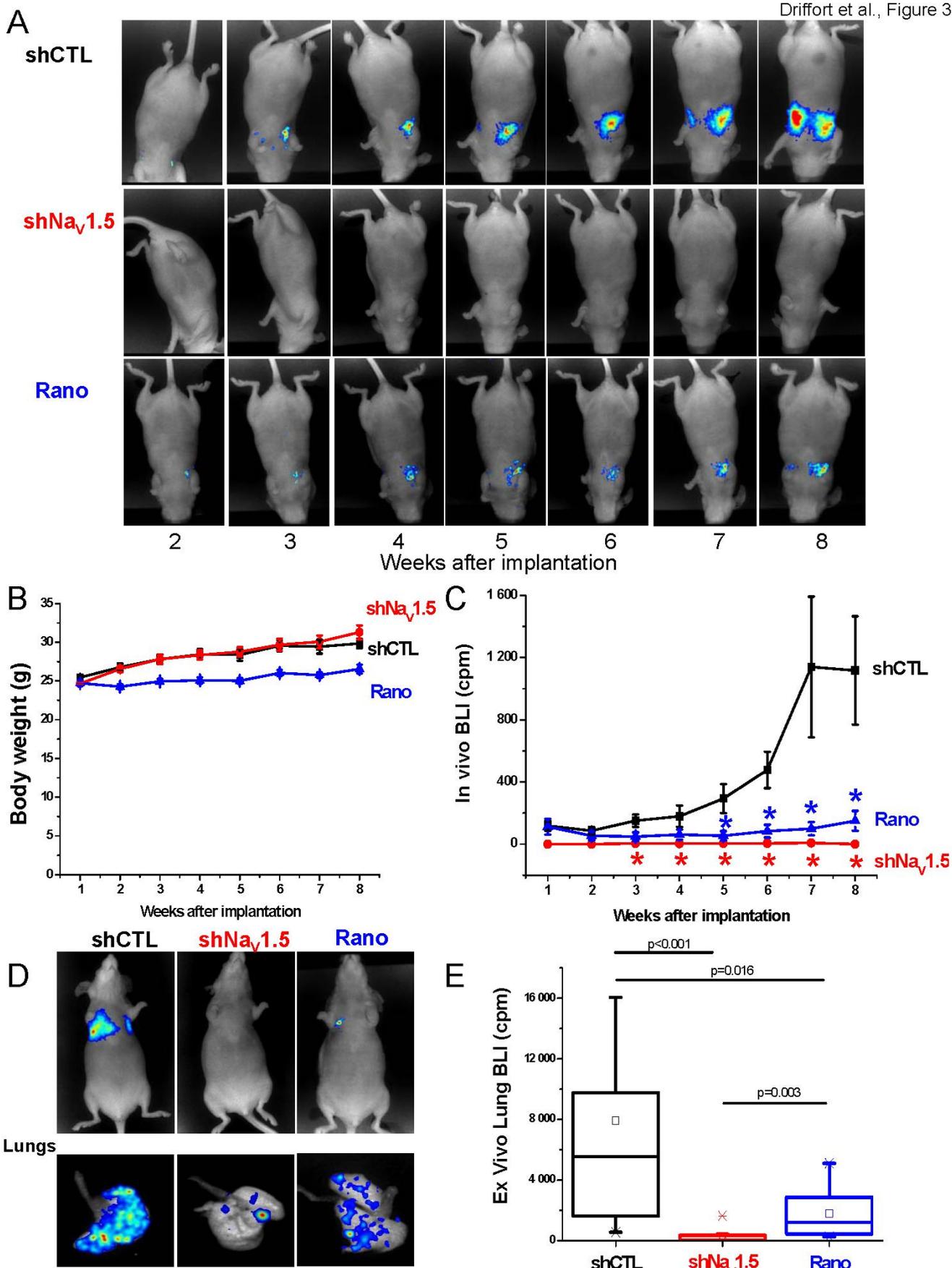
Sodium currents ( $I_{Na}$ ) from MDA-MB-231 breast cancer cells stably expressing null target shRNA (shCTL) were studied in voltage-clamp mode with the whole-cell configuration of the patch clamp technique. **A**, Left, representative  $I_{Na}$ -voltage traces obtained from one cell before (vehicle) and after 50  $\mu$ M ranolazine treatment (Rano). Right, mean  $\pm$  s.e.m. steady-state  $I_{Na}$ -voltage relationships obtained from cancer cells before and after incubation with 50  $\mu$ M ranolazine ( $n = 12$  cells) from a holding potential of -100 mV. There is a statistical difference between the two conditions for voltages ranging from -35 to +40 mV ( $p < 0.001$ , Wilcoxon test). **B**, Activation-voltage relationships obtained in presence (red trace) or not (vehicle, black trace) of 50  $\mu$ M ranolazine. **C**, Availability-voltage relationships obtained in presence (red trace) or not (vehicle, black trace) of 50  $\mu$ M ranolazine. There is a statistical difference between the two conditions for voltages ranging from -105 to -75 mV ( $p < 0.001$ , Wilcoxon test).



**Figure 2: Ranolazine inhibits the Na<sub>v</sub>1.5-mediated breast cancer cell invasiveness *in vitro*.**

**A**, *SCN5A* mRNA expression assessed by real-time qPCR in shCTL and shNa<sub>v</sub>1.5 cells (n=10 separate experiments) and compared with a Mann-Whitney test. **B**, Mean ± s.e.m. peak I<sub>Na</sub> recorded in 23 shCTL cells and in 20 shNa<sub>v</sub>1.5 cells under a depolarization from -100 to -5 mV (Mann-Whitney test). Representative currents are shown underneath. **C**, shCTL and shNa<sub>v</sub>1.5 cell growth and viability after 5 days, expressed relative to the shCTL cell line (n= 3 independent experiments). **D**, Cell viability of shCTL after 5 days of growth in presence of increasing concentrations of ranolazine, from 0.1 to 100 μM, and expressed relative to the control condition without ranolazine (vehicle). **E**, Effect of 30 μM tetrodotoxin (TTX) or 50 μM ranolazine (Rano) on shCTL and shNa<sub>v</sub>1.5 human breast cancer cell invasiveness (Kruskal-wallis analysis followed by a Dunn's test). **F**, shCTL and shNa<sub>v</sub>1.5 cells were cultured for 24h on a Matrigel™-composed matrix treated with 50 μM ranolazine (Rano) or not. F-actin cytoskeleton was stained with phalloidin-AlexaFluor594. A cell circularity index was calculated using ImageJ© software (n= 138-238 cells analysed, Mann-Whitney test). **G**, shCTL cells were cultured on a Matrigel™-composed matrix containing DQ-Gelatin® for 24h in presence or not of 50 μM ranolazine. A “Matrix-Focalized-degradation activity index” was calculated as being the number of pixels corresponding to the co-localization of F-actin condensation areas (F-actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa594) and focal spots of DQ-gelatin proteolysis (coloc) (7). Results are expressed relative to the control condition (CTL, N= 534 cells) without ranolazine (Rano, N= 375 cells) and compared using Mann-Whitney test. Representative pictures are shown on the left.

Statistical significance is indicated as: \*, p <0.05; \*\*, p<0.01 and \*\*\*, p<0.001. NS stands for not statistically different.



**Figure 3: Nav<sub>v</sub>1.5 suppression, or ranolazine treatment, inhibit metastatic lung colonisation by breast cancer cells.** **A**, Representative bioluminescent imaging (BLI) measurement performed in the same NMRI nude mouse per condition from week 2 to week 8 after cancer cell injection. Mice were injected with shCTL MDA-MB-231-Luc cells (shCTL), or with shNav<sub>v</sub>1.5 MDA-MB-231-Luc cells (shNav<sub>v</sub>1.5) or with shCTL MDA-MB-231-Luc cells and treated (5 days/week) with ranolazine (50 mg/kg) (Rano) or vehicle (shCTL, shNav<sub>v</sub>1.5). **B**, Evolution of mice body weight during the experiments in the same conditions than in A. **C**, Mean *in vivo* BLI value (expressed in cpm) as a function of time recorded in the whole body of mice coming from the three groups indicated previously (shCTL, n= 18; shNav<sub>v</sub>1.5, n= 12; Rano, n= 8) (Statistical significance is indicated as: \*, p <0.05, Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test). **D**, Representative BLI at completion of the study (8<sup>th</sup> week after cells injection), in whole animals and *ex vivo* after lung isolation. **E**, BLI quantification of excised lungs. Box plots indicate the first quartile, the median, and the third quartile, squares indicate the mean (shCTL, n= 18; shNav<sub>v</sub>1.5, n= 12; Rano, n= 8) (Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's test).

### C. Résumé de l'article

La lignée cellulaire MDA-MB-231 est issue d'une tumeur mammaire humaine très invasive ayant un phénotype très agressif. L'expression et l'activité de canaux sodiques dépendants du voltage  $\text{Na}_v1.5$  dans ces cellules participent à la dégradation de la matrice extracellulaire *in vitro*.

Dans cette étude nous avons montré que la ranolazine inhibait le courant sodique des cellules MDA-MB-231. En effet, à une concentration qui n'affecte pas la viabilité cellulaire (50  $\mu\text{M}$ ), la ranolazine diminue l'amplitude maximale du courant sodique de 30 % ( $-12,1 \pm 2,2$  mV en condition témoin (PSS);  $-8,8 \pm 1,7$  mV avec la ranolazine;  $n=13$  cellules) et décale les courbes d'activation et de disponibilité en fonction du voltage vers des potentiels plus hyperpolarisés (respectivement  $-2,1$  mV et  $-6,2$  mV). L'application de la ranolazine diminue également l'invasion de la matrice extracellulaire dépendante de l'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$  de  $17,4 \pm 3$  % ( $n=6$  expériences). Cet effet est spécifique de l'inhibition des canaux  $\text{Na}_v1.5$  puisque ce traitement n'a pas d'effet sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231 qui n'expriment plus ces canaux (sh $\text{Na}_v1.5$ ) (figure 2E de l'article ci-dessus). Les cellules ensemencées sur une matrice de Matrigel, en présence de ranolazine, présentent un phénotype moins agressif, elles deviennent plus rondes et ont une activité protéolytique diminuée de  $58,6 \pm 24$  % ( $n=375$  cellules). Sur les cellules MDA-MB-231, les effets de la ranolazine donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec la TTX ou un shRNA dirigé contre l'expression de  $\text{Na}_v1.5$ . La ranolazine semble donc être un bon inhibiteur pharmacologique des canaux  $\text{Na}_v1.5$ .

Les cellules MDA-MB-231 ont été modifiées génétiquement pour exprimer la luciférase. L'activité de cette protéine est indispensable pour suivre *in vivo* la croissance tumorale. En effet, à la suite d'une injection de luciférine par voie intra-péritonéale, la luciférase exprimée dans les cellules va catalyser l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine provoquant ainsi l'émission d'un photon. Nous avons montré que l'injection des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 dans la veine caudale de souris immunodéprimées (NMRI nude) entraînait une colonisation préférentielle des poumons par ces cellules. Cette colonisation est croissante et continue pendant les 8 semaines de l'expérimentation. L'analyse de la bioluminescence *ex vivo* des organes (poumons, foie, rate, reins, cerveau, os des pattes, rachis et côtes) nous a permis de confirmer la présence de cellules cancéreuses mammaires principalement dans les poumons. La quantification de la bioluminescence (mesurée en photons comptés par minute, count per minute cpm) met en évidence une diminution de la colonisation pulmonaire dans le groupe ayant été injecté avec des cellules sh $\text{Na}_v1.5$ , proche de celle obtenue avec les souris injectées avec les cellules shRD (exprimant  $\text{Na}_v1.5$ ) mais ayant reçu une

injection de ranolazine (50 mg/kg/jour ; 5 jours sur 7), par rapport aux souris du groupe témoin (injectées avec les cellules shRD et sans traitement à la ranolazine).

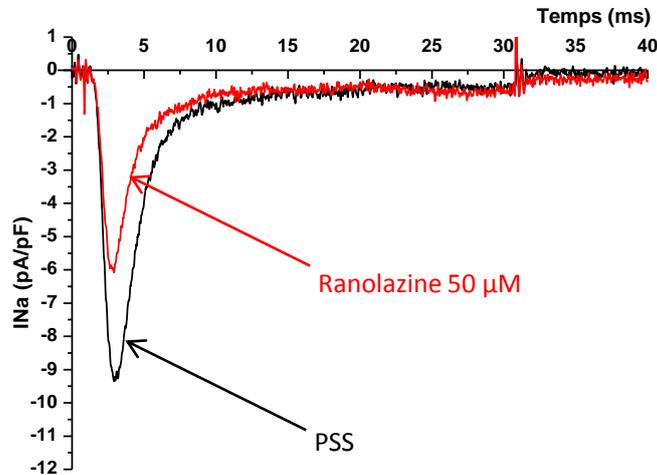
Nous avons ainsi établi un lien direct entre l'activité des canaux  $Na_v1.5$  des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 et la colonisation pulmonaire *in vivo*. De plus, l'utilisation de la ranolazine qui est déjà utilisée en clinique pour cibler les canaux sodiques, diminue efficacement la colonisation métastatique sans effet secondaire apparent.

## D. Discussion

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les canaux sodiques dépendants du voltage intervenaient dans le processus d'invasivité des cellules cancéreuses mais peu d'articles (Davis et al., 2012; Fraser et al., 2005; Yildirim et al., 2012) démontrent leur rôle *in vivo* dans le développement et la croissance de la tumeur primaire et des métastases. Nous nous sommes donc intéressés dans cette étude à l'implication des canaux  $Na_v1.5$ , exprimés dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231, dans un premier temps, dans la croissance tumorale et le développement de métastases chez des souris immunodéprimées et dans un deuxième temps à l'intérêt de son inhibition pharmacologique par la ranolazine. L'effet de la ranolazine a tout d'abord été caractérisé sur le courant sodique ainsi que sur l'invasivité cellulaire *in vitro* des cellules MDA-MB-231 puis *in vivo* sur des souris immunodéprimées. Une récente étude menée par l'équipe de M.L. Brown montre sur un modèle murin qu'après une injection sous-cutanée de cellules cancéreuses prostatiques humaines (PC3) exprimant des canaux  $Na_v$ , une inhibition pharmacologique de l'activité de ces canaux par un composé synthétique (2-(3-chlorophényl)-2-Hydroxynonanamide) entraîne une diminution de la taille de la tumeur primaire de 62 %. Ce composé, *in vitro*, diminue l'Ina de  $31,9 \pm 2,9$  % (n = 3) à 1  $\mu$ M et de  $87,0 \pm 3,1$  % (n = 3) à 10  $\mu$ M. Le composé a été administré par voie intrapéritonéale à 10 mg/kg/jour (Davis et al., 2012).

Dans une étude en système d'expression (HEK-293 exprimant  $Na_v1.5$  sauvage ou  $Na_v1.5$  portant les mutations  $\Delta$ KPQ ou Y1795C impliquées dans le syndrome de QT long de type 3), la ranolazine diminue l'activité des canaux sodiques  $Na_v1.5$  : elle inhibe en effet d'environ 20 % l'amplitude du courant de pic ( $IC_{50} = 135$   $\mu$ M) mais inhibe plus spécifiquement d'environ 70 % le courant sodique persistant ( $IC_{50} = 15$   $\mu$ M) induit par la mutation de  $Na_v1.5$  (Fredj et al., 2006). Dans notre étude, la ranolazine diminue l'amplitude maximale du courant sodique et décale les courbes d'activation et de disponibilité en fonction du voltage vers des potentiels plus hyperpolarisés (-2,1 mV et - 6,2 mV respectivement) ce qui diminue la fenêtre de voltage dans laquelle une partie des canaux  $Na_v$  sont toujours activés et entraîne potentiellement une diminution du courant sodique au potentiel de

membrane des cellules ("courant de fenêtre"). Cependant aucun effet sur le courant persistant n'a été observé (figure 25). Ce dernier résultat est surprenant mais le courant persistant observé est très faible ce qui rend difficile l'estimation de l'effet de la ranolazine.



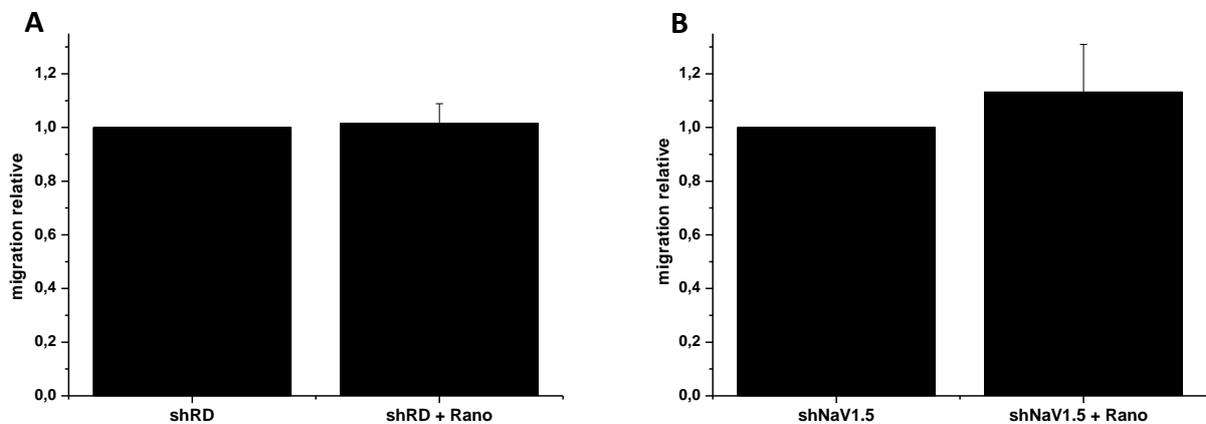
**Figure 25 :** figure représentative de l'effet de la ranolazine sur le courant sodique.

Courant sodique enregistré lors d'un protocole de dépolarisation à -5 mV en condition physiologique (courbe noire, PSS, physiological saline solution) ou après l'application de ranolazine à 50  $\mu$ M (courbe rouge). La ranolazine a diminué le courant de pic mais n'a pas affecté le courant persistant (observé en fin de protocole).

La vératridine (un alcaloïde végétal) est une molécule connue pour entraîner une augmentation du courant persistant. En effet, cette molécule se fixe sur les canaux  $Na_v$ , bloque l'inactivation et déplace le seuil d'activation vers des potentiels plus négatifs ce qui conduit à une activité plus grande des canaux sodiques (Cestele and Catterall, 2000; Wang and Wang, 2003). Pour compléter notre étude, il serait donc intéressant d'appliquer au préalable la vératridine afin d'augmenter le courant persistant puis d'appliquer la ranolazine. Ceci nous permettrait peut-être de mesurer son effet sur le courant persistant. Il a également été montré, en système d'expression (HEK-293) ou dans des cardiomyocytes de rat (en situation d'ischémie cardiaque), que l'hypoxie augmente le courant sodique persistant (Hammarstrom and Gage, 2002; Saint, 2006). L'effet de la ranolazine sur l'activité de  $Na_v1.5$  pourrait également être testé en condition hypoxique. L'hypoxie pourrait être mimée en faisant passer un filet d'azote dans le milieu extracellulaire des cellules étudiées par la technique de patch clamp.

Afin de déterminer si la ranolazine avait des effets similaires à la TTX sur le phénotype agressif des cellules MDA-MB-231, plusieurs études ont été effectuées. Tout d'abord, la ranolazine diminue significativement l'invasivité des cellules (de  $17,4 \pm 3$  %) sans effet sur la viabilité cellulaire (Figure 2 D et E de l'article ci-dessus) ni sur la migration cellulaire (figure 26 A). Lorsque la ranolazine est

appliquée sur des cellules qui n'expriment plus les canaux  $\text{Na}_v1.5$ , aucun effet n'est observé, ni sur l'invasion (Figure 2 E de l'article ci-dessus), ni sur la migration (figure 26 B). Ceci renforce la spécificité de la ranolazine dans nos cellules comme inhibiteur des canaux  $\text{Na}_v1.5$ .



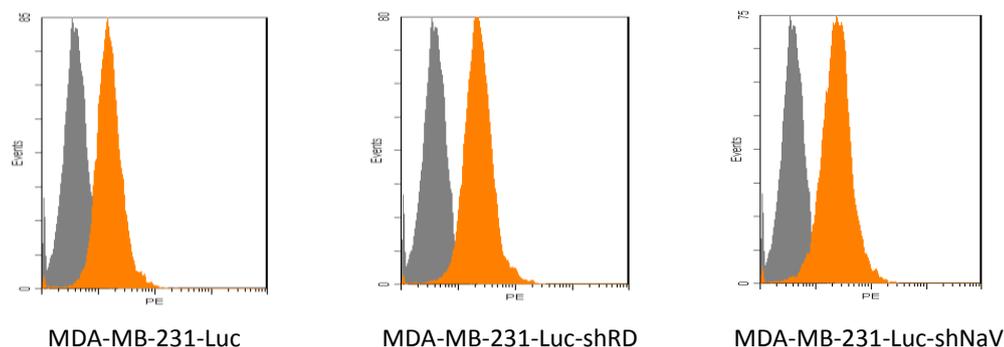
**Figure 26 :** Effet de la ranolazine sur la migration des cellules MDA-MB-231.

A, Les cellules exprimant les canaux  $\text{Na}_v1.5$  (shRD) ou B, les cellules n'exprimant pas  $\text{Na}_v1.5$  (sh $\text{Na}_v1.5$ ) sont ensemencées sur des inserts de migration (sans Matrigel). La ranolazine a été appliquée à une concentration finale de 50  $\mu\text{M}$ . Après 24h de migration, les cellules présentes sur la face inférieure de l'insert sont fixées puis comptées. Aucun effet significatif de la ranolazine sur la migration des cellules n'est observé dans ces deux lignées. Les résultats sont non statistiquement différents ( $n=3$ ). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. Les résultats ne sont pas statistiquement différents.

L'inhibition du courant sodique par la ranolazine augmente la circularité des cellules (figure 2 F de l'article ci-dessus) et diminue la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (figure 2 G de l'article ci-dessus) dans les mêmes proportions que les effets produits par la TTX dans notre première étude (Brisson et al. 2011). La ranolazine semble donc avoir les mêmes effets que la TTX sur les propriétés invasives des cellules cancéreuses MDA-MB-231 via une diminution du courant  $I_{\text{Na}}$  et sans effet cytotoxique. Il serait intéressant de tester l'effet anti-invasif de la ranolazine sur d'autres types de cellules cancéreuses exprimant d'autres isoformes de  $\text{Na}_v$  telles que les cellules cancéreuses pulmonaires H460 (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007), ou encore les cellules cancéreuses prostatiques PC3 qui expriment  $\text{Na}_v1.7$  (Bennett et al., 2004; Davis et al., 2012).

Afin de déterminer le rôle des canaux sodiques dans la croissance tumorale et le développement de métastases, deux modèles animaux ont été développés. Ces deux modèles utilisent des souris immunodéprimées. Nous avons au préalable vérifié l'expression de la luciférase dans les deux lignées cellulaires utilisées (shRD et sh $\text{Na}_v1.5$ ) pour l'expérimentation animale (figure 27). L'étude par cytométrie en flux de l'expression de la luciférase ne montre aucune différence entre les cellules MDA-MB-231-Luc-shRD et les cellules MDA-MB-231-Luc-sh $\text{Na}_v1.5$  (figure 27).

#### A/ Immunomarquage de la luciférase



**Figure 27 :** Analyse par cytométrie en flux de l'expression protéique de la luciférase dans les lignées transformées issues de MDA-MB-231.

Les cellules sont mises en suspension puis fixées dans l'éthanol. La luciférase est détectée par immunomarquage grâce à un anticorps primaire anti-luciférase et un anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine.

Un premier modèle de xénogreffe a été développé, qui permet d'étudier la colonisation métastatique des organes par les cellules cancéreuses après injection des cellules MDA-MB-231 dans la veine caudale de souris nude. Dans cette étude, nous avons montré que les cellules MDA-MB-231-shRD colonisaient préférentiellement les poumons et se développaient rapidement (groupe de souris témoin). La colonisation pulmonaire après l'injection des cellules MDA-MB-231 n'exprimant plus les canaux  $Na_v1.5$  (sh $Na_v1.5$ ) est plus faible que dans le groupe de souris témoin.

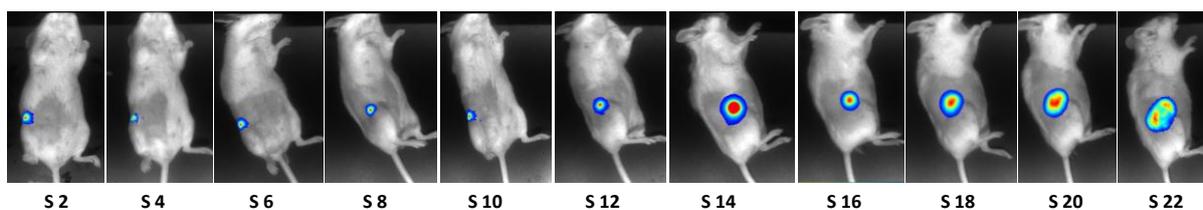
L'inhibition de l'expression des canaux sodiques (cellules sh $Na_v1.5$ ) semble donc inhiber le potentiel métastatique des cellules MDA-MB-231 *in vivo*. Une injection de ranolazine aux souris (à raison de 50 mg/kg/jour 5 jours sur 7) ayant reçu des cellules qui expriment  $Na_v1.5$  (cellules shRD) diminue également de façon significative la colonisation pulmonaire induite par  $Na_v1.5$ . Afin de compléter l'étude, la bioluminescence de différents organes (poumons, foie, rate, cerveau, pattes, rachis, côtes) a été analysée *ex vivo* après le sacrifice des animaux, révélant les os (rachis, côtes, pattes) comme autre site métastatique potentiel (4 souris sur 17 dans le groupe shRD témoin et 1 souris sur 12 dans le groupe sh $Na_v1.5$ ). Plusieurs phénomènes pourraient expliquer l'absence de détection des sites métastatiques : un nombre trop faible de cellules ayant envahi de nouveaux tissus ou encore une activité de la luciférase insuffisante dans ces cellules pour que les photons émis (suite à la dégradation de la luciférine par la luciférase des cellules) soient détectés par l'imageur. Afin de s'assurer que la bioluminescence est bien proportionnelle à la quantité de cellules cancéreuses humaines présente dans les organes, nous pourrions réaliser des analyses immunohistochimiques (par marquage d'une protéine spécifique des cellules humaines). Les analyses

immunohistochimiques seraient également intéressantes afin de confirmer, par rapport aux études faites précédemment *in vitro* sur matrice, la colocalisation des protéines Na<sub>v</sub>1.5, NHE-1 et de la cavéoline 1 dans les cellules MDA-MB-231 prélevées des tumeurs métastatiques qui ont évolué dans un environnement matriciel naturel.

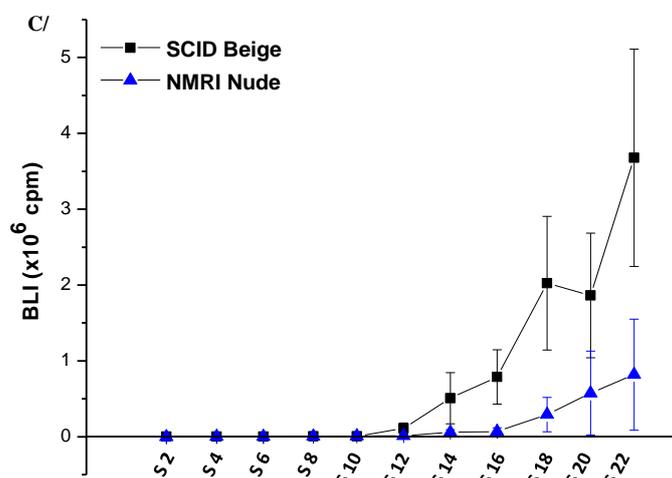
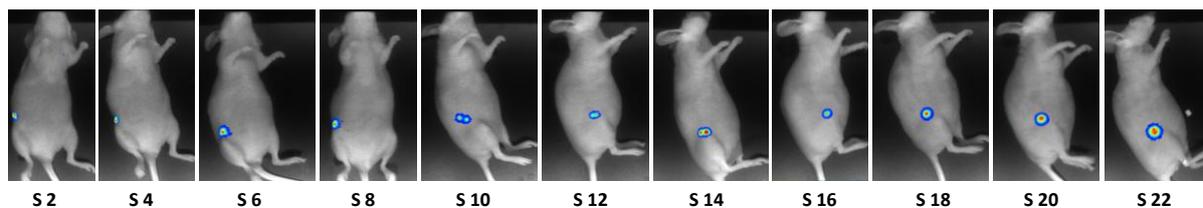
Cette étude décrit pour la première fois un lien entre l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 et le fort potentiel invasif des cellules MDA-MB-231 *in vivo*. De plus, il semble que l'inhibition pharmacologique de Na<sub>v</sub>1.5 par la ranolazine, molécule déjà utilisée en clinique, peut être efficace pour réduire cette colonisation pulmonaire sans effet toxique apparent. On pourrait toutefois étudier l'apparition éventuelle d'effets secondaires dans le groupe de souris recevant de la ranolazine par des mesures électrocardiographiques (par télémétrie par exemple).

Un modèle de xénogreffe orthotopique a été mis au point en parallèle. Les cellules MDA-MB-231 sont injectées, par microchirurgie, directement dans le quatrième bourgeon mammaire (fat-pad). Ce modèle nous permettrait d'analyser plus précisément le rôle de nos protéines d'intérêt (Na<sub>v</sub>1.5, NHE-1) dans l'installation des cellules cancéreuses *in situ*, la croissance de la tumeur primaire et dans le développement de métastases suite à l'injection des cellules MDA-MB-231 dans le bourgeon mammaire d'une souris. Pour la mise au point de cette expérimentation, deux souches de souris ont été testées (NMRI nude et SCID beige, figure 28) ainsi que l'utilisation ou non d'une matrice (Puramatrix) lors de l'implantation des cellules. Pour cette première étude, seule les cellules MDA-MB-231-Luc-shRD ont été injectées. La bioluminescence des cellules *in vivo* ainsi que le poids des souris ont été relevés chaque semaine pendant 22 semaines (figure 28). Les résultats obtenus montrent un développement de la tumeur primaire plus faible chez les souris NMRI nude que chez les souris SCID beige. L'utilisation des souris SCID beige, pour ce modèle de xénogreffe est donc apparue plus adaptée. L'utilisation d'une matrice n'ayant pas d'effet pour l'installation des cellules cancéreuses et la croissance de la tumeur primaire, nous avons décidé de ne plus l'utiliser pour la suite des expérimentations.

A/ Souris SCID Beige



B/ Souris NMRI Nude



**Figure 28 :** Développement *in vivo* des cellules MDA-MB-231 après une xéno greffe orthotopique.

Deux souches de souris, SCID beige (A) et NMRI Nude (B), ont été greffées avec les cellules MDA-MB-231-Luc-shRD et suivies pendant 22 semaines. (C) La bioluminescence en photons par minute (counts per minute, cpm) de la tumeur greffée. Moyenne  $\pm$  sem de la bioluminescence des 6 souris en fonction du temps dans les deux groupes. n=6 souris par groupe.

Aucun développement métastatique n'a pu être observé par mesure de la bioluminescence *in vivo*. La bioluminescence des cellules au sein d'un organe peut être trop faible pour que le signal traverse l'ensemble des tissus et soit détectée par l'imageur. De plus, le signal important de la tumeur primaire peut masquer le faible signal des sites métastatiques potentiels. C'est pourquoi la bioluminescence des organes (poumons, foie, rate, cerveau, pattes, rachis, côtes) a été analysée *ex vivo*, après le sacrifice de l'animal. Ceci a permis de révéler des sites métastatiques au niveau des os, poumons, foie pour 2 des 6 souris SCID beige. Une souris présentait également des métastases aux reins ainsi qu'aux ganglions mésentériques. Seulement une souris NMRI nude sur 6 présentait des

métastases au niveau des os. Il serait intéressant de continuer à développer et optimiser ce modèle animal qui pourrait permettre de répondre aux questions quant au rôle de  $Na_v1.5$  dans la progression cancéreuse mammaire *in vivo* : les canaux sodiques des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 influencent-ils le développement de la tumeur primaire ? Ont-ils un rôle dans le développement des métastases et leur localisation ? Par ailleurs, l'analyse macroscopique après l'autopsie des souris a révélé que la tumeur primaire était faiblement vascularisée. Ceci pourrait être la cause de la faible dissémination des cellules cancéreuses dans les autres tissus. L'absence de cautérisation entre les bourgeons mammaires 4 et 5 pourra également être testée afin de maintenir la circulation sanguine et lymphatique du quatrième bourgeon et potentiellement favoriser la croissance tumorale. De plus, il serait intéressant de pouvoir mesurer la production, par les cellules MDA-MB-231, de molécules angiogéniques telles que les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, Vascular endothelium growth factor) ou encore l'activité des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ce phénomène (HIF, Akt, NOS, prostaglandine, etc.). En effet,  $Na_v1.5$  semble intervenir dans la régulation de la voie de signalisation induite par le VEGF des cellules endothéliales HUVEC (Andrikopoulos et al., 2011).

# III. Régulation de l'invasivité cellulaire et de la colonisation pulmonaire par la sous-unité auxiliaire $\beta 4$ des canaux sodiques

---

## A. Introduction

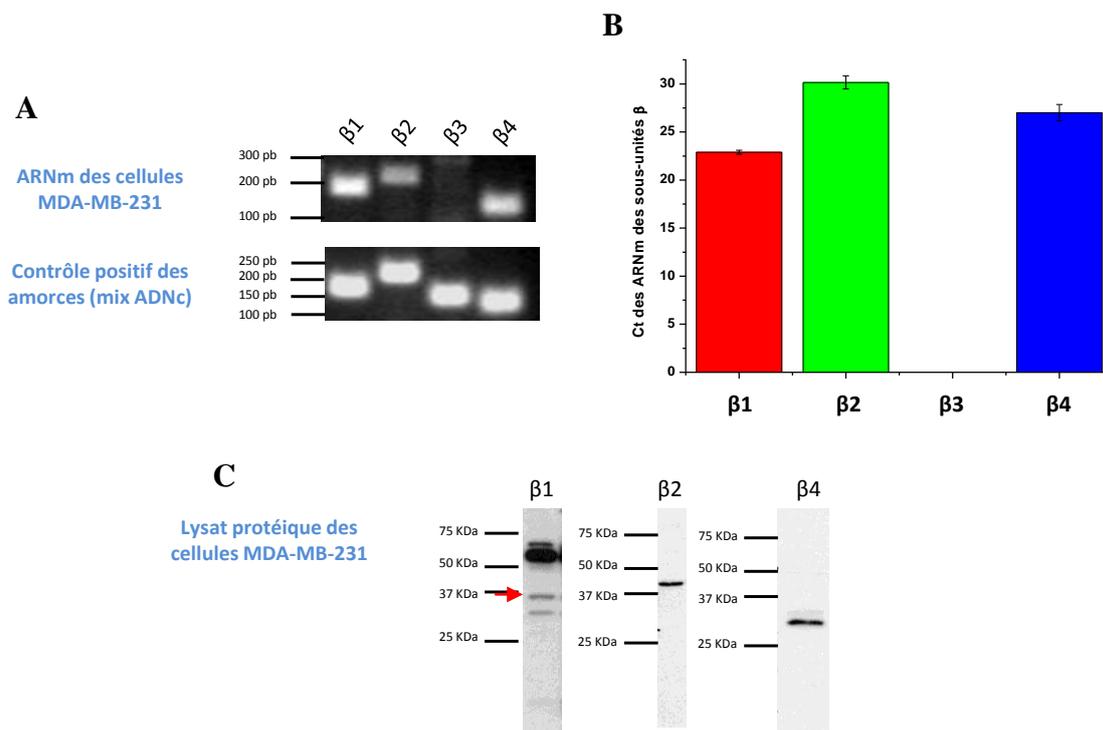
En 2009, L. Gillet et collaborateurs ont montré que les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 expriment les ARNm des gènes *SCN1B*, *SCN2B* et *SCN4B*, et non ceux du gène *SCN3B* (Gillet et al., 2009). En effet, des sous-unités auxiliaires  $\beta$  sont connues pour réguler l'adressage et les propriétés biophysiques des canaux  $\text{Na}_v$ , et de ce fait, elles pourraient moduler l'invasivité dépendante de  $\text{Na}_v 1.5$  dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231

L'objectif de notre étude était d'étudier l'expression et le rôle des sous-unités auxiliaires  $\beta$  dans les cellules cancéreuses. Une partie des travaux de cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Maria-Luisa Cayuella et celle du Dr Pablo Pelegrin à l'hôpital Virgen de la Arrixaca de Murcia en Espagne où je me suis rendue pendant deux semaines. J'ai ainsi pu participer, aux études immunohistochimiques sur l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans des biopsies de tissus mammaires et pulmonaires (sains et cancéreux *in situ* et métastatiques) ainsi qu'à l'étude de l'invasivité cellulaire sur un modèle d'embryon de poisson zèbre (*Danio rerio*).

## B. Résultats - Discussion

### 1. Expression et rôles des sous-unités $\beta$ dans la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires

Dans les cellules MDA-MB-231, il a précédemment été décrit la présence d'ARNm des sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$  (Gillet et al., 2009). Nous avons voulu approfondir cette étude en vérifiant l'expression en ARNm et en protéine de ces trois sous-unités  $\beta$ . Ces études ont été réalisées par PCR semi-quantitative pour l'étude des ARNm et par western blot pour l'étude de l'expression protéique. Les résultats sont présentés dans la figure 29.

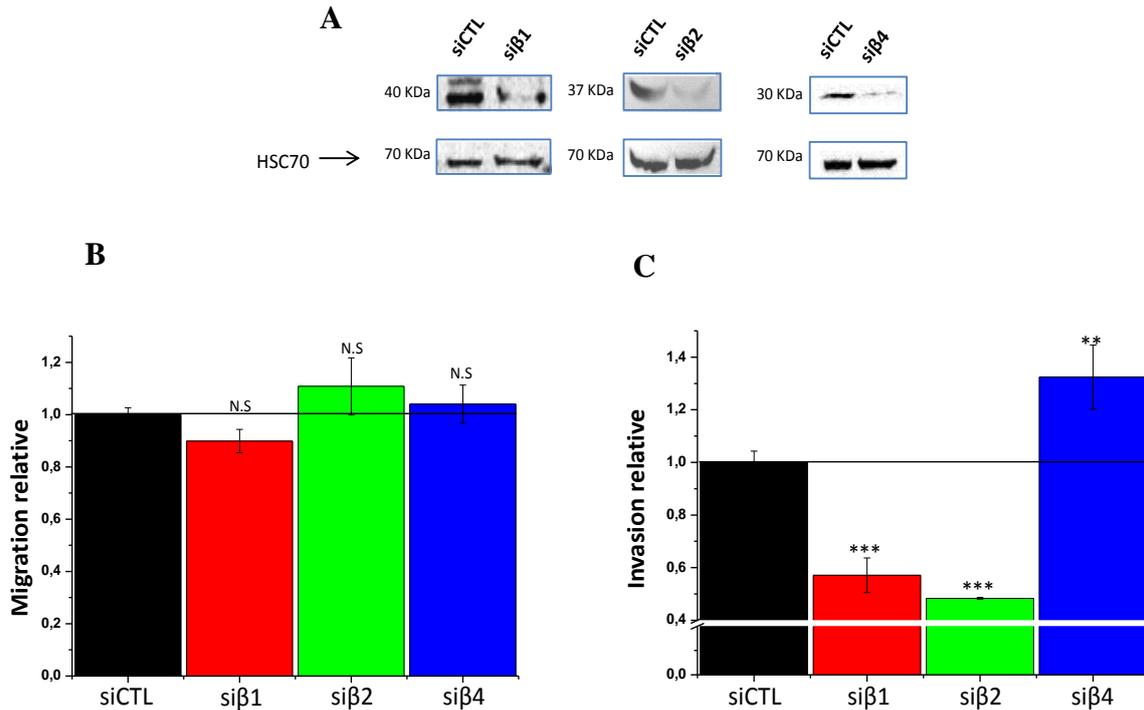


**Figure 29 :** Expression transcriptionnelle et protéique des sous-unités  $\beta$  dans les cellules MDA-MB-231.

Les ARN totaux des cellules MDA-MB-231 ont été extraits. A, L'expression en ARNm des sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_4$  a été révélée par PCR conventionnelle suivie d'une électrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose. Le mix ADNc est un mélange d'ADNc de différentes lignées (MCF-10A, MCF-7, HUVEC, MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-468, A549, H460, PC3). B, L'expression des ARNm des sous-unités  $\beta$  a également été étudiée par PCR semi-quantitative (l'expression en ARNm est inversement proportionnelle à la valeur de Ct obtenue). N = 4 expériences indépendantes C, L'expression en protéine de chaque sous-unité  $\beta$  a été révélée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques. Images représentatives de trois expériences indépendantes.

On observe que les cellules MDA-MB-231 expriment les ARNm des sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_4$  ce qui est en accord avec l'étude précédente (Gillet et al., 2009), ainsi que les protéines. L'analyse par PCR semi-quantitative révèle une forte expression d'un gène lorsque le Ct est faible (il faut moins de cycles de PCR pour détecter les produits amplifiés). Dans les cellules MDA-MB-231, la sous-unité  $\beta_1$  (Ct  $22,9 \pm 0,2$ ) semble être la sous-unité la plus exprimée, la sous-unité  $\beta_2$  (Ct  $30,15 \pm 0,7$ ) semble être huit fois moins exprimée que  $\beta_1$  et la sous-unité  $\beta_4$  (Ct  $27,0 \pm 0,8$ ) est quatre fois moins exprimée que  $\beta_1$ .

L'implication de ces sous-unités  $\beta$  dans les propriétés de migration et d'invasivité des cellules MDA-MB-231 a été étudiée en inhibant transitoirement leur expression à l'aide de siRNA dirigés spécifiquement contre chacune des trois sous-unités (si $\beta_1$ , si $\beta_2$  et si $\beta_4$ ), et comparée à l'utilisation d'un siRNA ne ciblant aucun gène connu (siCTL) (figure 30).



**Figure 30 :** Effet de l'inhibition de l'expression des sous-unités  $\beta$  sur la migration et l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

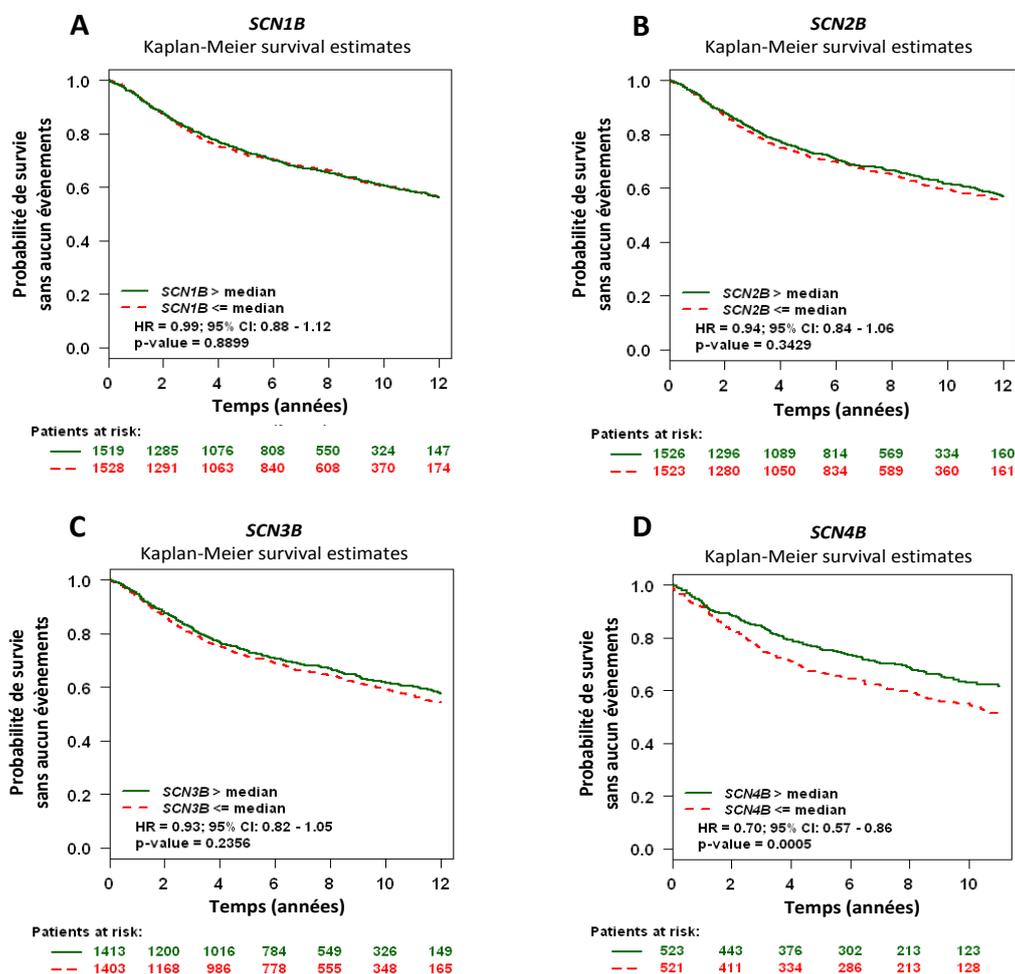
A, Effet des siRNA sur l'inhibition de l'expression protéique des sous-unités  $\beta$  dans les cellules MDA-MB-231 évalué par western blot 72h après la transfection. Les capacités de migration (B) et d'invasivité (C) des cellules ont été évaluées sur 24h. N.S. : statistiquement non différent, Statistiquement différent à \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport à la condition siCTL (test de Mann-Whitney). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem de N = 3 expériences.

Nous avons observé que les siRNA diminuaient efficacement (diminution maximale 72h après transfection) et spécifiquement l'expression des sous-unités  $\beta$ . L'inhibition de l'expression des ces trois protéines n'entraînait pas d'effet sur la migration *in vitro* des cellules MDA-MB-231 mais induit un effet notable sur l'invasion de la matrice extracellulaire. En effet, l'inhibition de l'expression de  $\beta 1$  et de  $\beta 2$  diminue l'invasivité des cellules MDA-MB-231 de  $42,9 \pm 11,5$  % et  $51,6 \pm 0,7$  % respectivement. En revanche, l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  augmente d'environ  $32,4 \pm 9,2$  % l'invasivité cellulaire. L'expression des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  favoriserait par conséquent l'invasivité des cellules MDA-MB-231 tandis que l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  aurait plutôt un effet inhibiteur sur l'invasivité cellulaire.

Les effets observés sont spécifiques à l'invasion d'une matrice extracellulaire par les cellules puisque aucun effet n'est observé sur la migration. Une équipe s'est récemment intéressée au rôle de la protéine  $\beta 1$  dans les cellules MDA-MB-231 et a montré que la surexpression de la protéine  $\beta 1$  dans ces cellules augmentait l'invasivité *in vitro* ainsi que la croissance tumorale et le développement de métastases dans un modèle de xénogreffe orthotopique chez des souris immunodéprimées (Nelson et al., 2014). Nos résultats semblent par conséquent en accord avec cette étude. En revanche, une

étude antérieure a montré que la surexpression de la sous-unité  $\beta 1$  dans les cellules MDA-MB-231 augmentait l'adhésion cellulaire et diminuait la prolifération et la migration des cellules (Chioni et al., 2009). Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par la différence entre les méthodologies utilisées : en effet dans cette étude *in vitro*, publiée en 2009, les auteurs ont réalisés la surexpression de la protéine  $\beta 1$  pourtant très fortement exprimée en condition endogène, tandis que nous avons inhibé cette son expression. Il se pourrait que la surexpression soit responsable d'effets non spécifiques.

D'après nos résultats (figure 30), la sous-unité  $\beta 4$  apparaît comme une protéine anti-invasive dans les cellules MDA-MB-231. Une méta-analyse transcriptomique, menée en collaboration avec l'équipe de P. Jézéquel (Centre Gauducheau, Saint Herblain), a été réalisée sur des données publiées de cohortes de patientes atteintes d'un cancer du sein (figure 31).



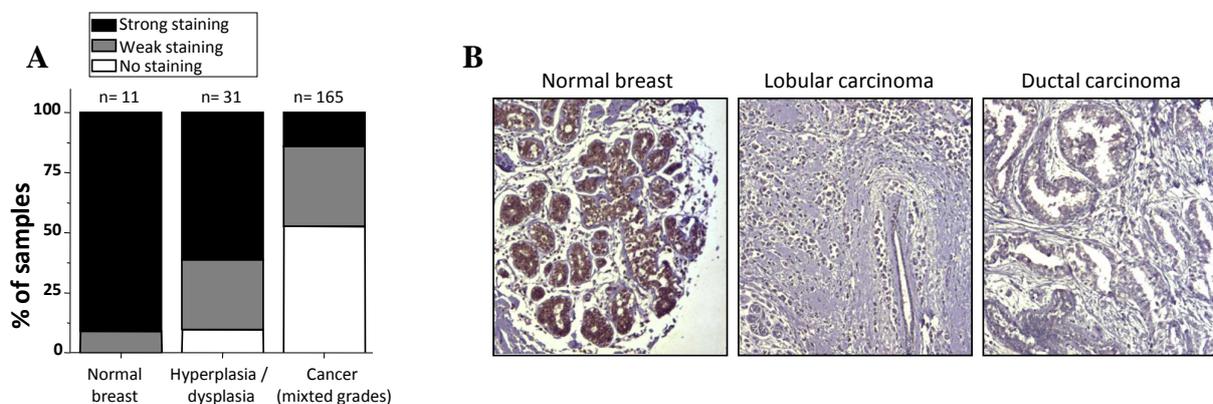
**Figure 31:** Analyse de la probabilité de survie des patientes atteintes d'un cancer du sein en fonction de l'expression des gènes des sous-unités  $\beta$ .

Relation entre l'expression des gènes *SCN1B* (A), *SCN2B* (B), *SCN3B* (C) et *SCN4B* (D) et la probabilité de survie de patientes atteintes d'un cancer du sein sans la réapparition d'aucun évènement (apparition ou rechute métastatique, décès). Les courbes rouges représentent les patientes dont l'expression des gènes est inférieure ou égale à la médiane. Les courbes vertes représentent les patientes dont l'expression des gènes est supérieure à la médiane. HR : Hazard Ratio (risque relatif) ; CI : Confidence Intervals (interval de confiance).

L'étude de l'expression en ARNm du gène *SCN4B* indique que la faible expression en ARNm de  $\beta 4$  est corrélée à une faible survie (augmentation du risque d'apparition ou de rechutes métastatiques et/ou de décès) des patientes atteintes d'un cancer du sein (figure 31 D). Sur ces mêmes cohortes, aucune corrélation n'a pu être établie entre la survie des patientes et le niveau d'expression des autres sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  (figure 31 A, B, C). La diminution de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans les cellules cancéreuses mammaires semble donc associée à leur caractère agressif.

## 2. Expression de la sous-unité $\beta 4$ dans l'invasivité *in vivo*

Les résultats obtenus précédemment sur le rôle de la sous-unité  $\beta 4$  dans l'invasivité des cellules cancéreuses nous ont conduits à nous interroger sur son expression au sein des tissus cancéreux humains. En collaboration avec l'équipe du Dr Pablo Pelegrin et avec l'aide du Dr Carlos Martines Caceres du service d'anatomo-pathologie (Murcia, Espagne), des marquages immunohistochimiques de la protéine  $\beta 4$  ont été réalisés. L'expression de  $\beta 4$  a été analysée sur des coupes de tissus mammaires non cancéreux (normal breast), hyperplasiques/dysplasiques, cancéreux de différents grades (grade I à III) (figure 32 A, B). Dans chacun de ces tissus, les niveaux d'expression de  $\beta 4$  sont classés par intensité de marquage : les tissus avec un marquage élevé de  $\beta 4$  (strong staining, couleur noire), ceux avec un marquage plus faible (weak staining, couleur grisée) et enfin des tissus où la protéine  $\beta 4$  n'est pas détectée (no staining, couleur blanche).



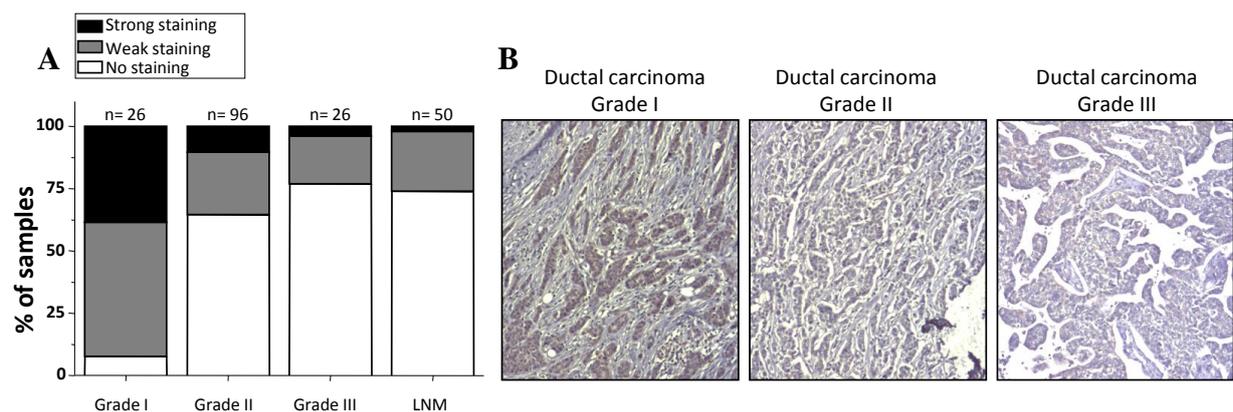
**Figure 32 :** Expression de la protéine  $\beta 4$  dans des tissus mammaires.

A, La protéine  $\beta 4$  est détectée par immunomarquage sur des biopsies de tissus mammaires non cancéreux (normal breast), hyperplasique/dysplasique (hyperplasia/dysplasia), cancéreux (cancer de tous grades). L'expression de  $\beta 4$  a été classée suivant trois intensités de marquage : fort (strong staining, couleur noire), faible (weak staining, couleur grise) ou sans aucun marquage (no staining, couleur blanche). La proportion d'échantillons présentant des marquages forts, faibles ou absents est indiquée en fonction du type histologique. B, Images représentatives de marquage de  $\beta 4$  en fonction du type histologique. n = nombre d'échantillons.

Cette étude montre un fort marquage de  $\beta 4$  dans les cellules épithéliales mammaires des tissus sains, où 90 % des échantillons ont une forte intensité de marquage. Le marquage de  $\beta 4$  semble diminué

dans les tissus hyperplasiques et dysplasiques puisque seuls 60 % des échantillons ont une forte intensité de marquage et 10 % montrent une absence de marquage. Dans les biopsies de tissus cancéreux, 50 % des échantillons ne présentent plus de marquage de  $\beta 4$  et seulement 12 % ont une intensité de marquage élevée. La diminution de l'expression de  $\beta 4$  semble donc associée au développement tumoral dans la glande mammaire.

Nous avons également étudié l'expression de  $\beta 4$  dans les biopsies de tumeurs mammaires (figure 33 B, C) en fonction de différents grades tumoraux allant du grade le moins agressif (grade I) au grade le plus agressif (III). Certaines métastases au niveau des ganglions lymphatiques, associées à une tumeur primaire, ont également été analysées (LNM). Les résultats obtenus montrent une diminution progressive du marquage de  $\beta 4$  lorsque les tumeurs sont de grade de plus en plus agressif, reflétant une diminution de son expression. En effet, sur les biopsies de tumeurs mammaires, seulement 10 % des échantillons de grade I ne présentent pas de marquage de  $\beta 4$ , contre 65 et 75 % des échantillons de grade II et III respectivement.



**Figure 33 :** Expression de la protéine  $\beta 4$  dans des tissus cancéreux mammaires.

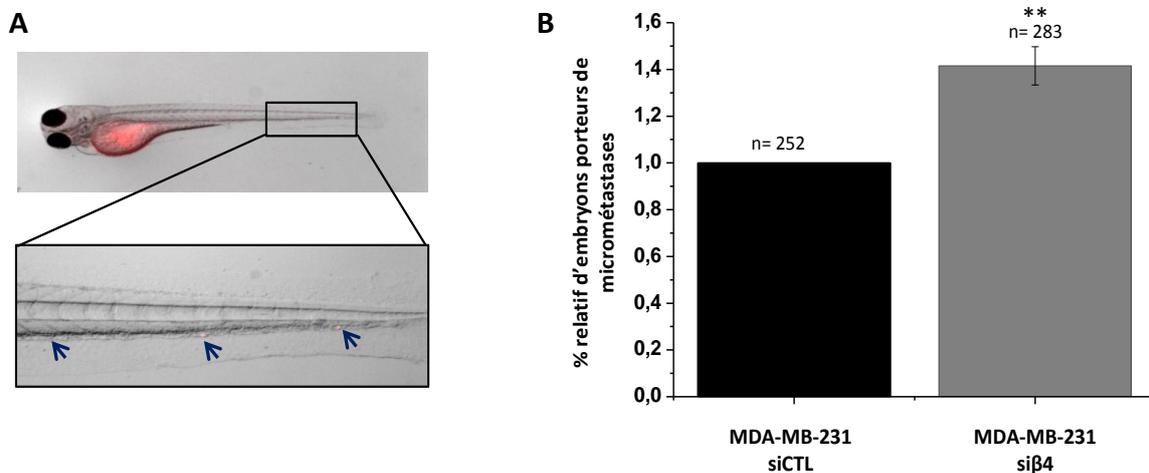
A, La protéine  $\beta 4$  est détectée par immunomarquage sur des biopsies de tissus cancéreux mammaires de grade I, II et III ainsi que sur des biopsies de métastases dans les ganglions lymphatiques (LNM). L'expression de  $\beta 4$  a été classée suivant trois intensités de marquage : fort (strong staining, couleur noire), faible (weak staining, couleur grise) ou sans aucun marquage (no staining, couleur blanche). La proportion d'échantillons présentant des marquages forts, faibles ou absents est indiquée en fonction du grade histologique. B, Images représentatives de marquage de  $\beta 4$  en fonction du grade histologique.

Ces deux études immunohistochimiques permettent d'établir une corrélation entre la diminution d'expression de la sous-unité  $\beta 4$  et le développement tumoral d'une part et la progression métastatique d'autre part. En revanche, seules les métastases au niveau des ganglions lymphatiques ont été analysées. Il serait donc intéressant de pouvoir étudier l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans des métastases d'autres tissus.

Les études réalisées *in vitro* et les analyses immunohistochimiques sur des biopsies de tissus cancéreux humains suggèrent que la diminution d'expression de la sous-unité  $\beta 4$  est associée à une augmentation d'agressivité cancéreuse et à la progression tumorale.

### 3. Rôle de la sous-unité $\beta 4$ dans l'invasivité *in vivo*

Nous avons voulu déterminer si les résultats d'invasivité *in vitro* seraient confirmés *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'invasivité cellulaire *in vivo* sur des embryons de poissons zèbres (*Danio rerio*). Les cellules ont été transfectées avec le siRNA (siCTL ou si $\beta 4$ ) 24h avant leur injection dans la cavité vitelline des embryons. Dans ce modèle, l'invasivité des cellules est caractérisée par leur capacité à traverser la paroi de la cavité vitelline pour se retrouver dans les organes de l'embryon (souvent au niveau de la queue). Si plus de trois cellules sont retrouvées dans les organes de l'embryon 48h après l'injection, l'embryon est alors considéré comme positif pour la formation de "micrométastases". Les résultats présentés dans le graphique de la figure 34, montrent que l'inhibition de l'expression de la protéine  $\beta 4$  augmente le nombre d'embryons développant des "micrométastases". Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus lors des tests d'invasivité *in vitro* (figure 30 C). Cette étude semble donc confirmer le rôle potentiel de la sous-unité  $\beta 4$  comme protéine anti-invasive.



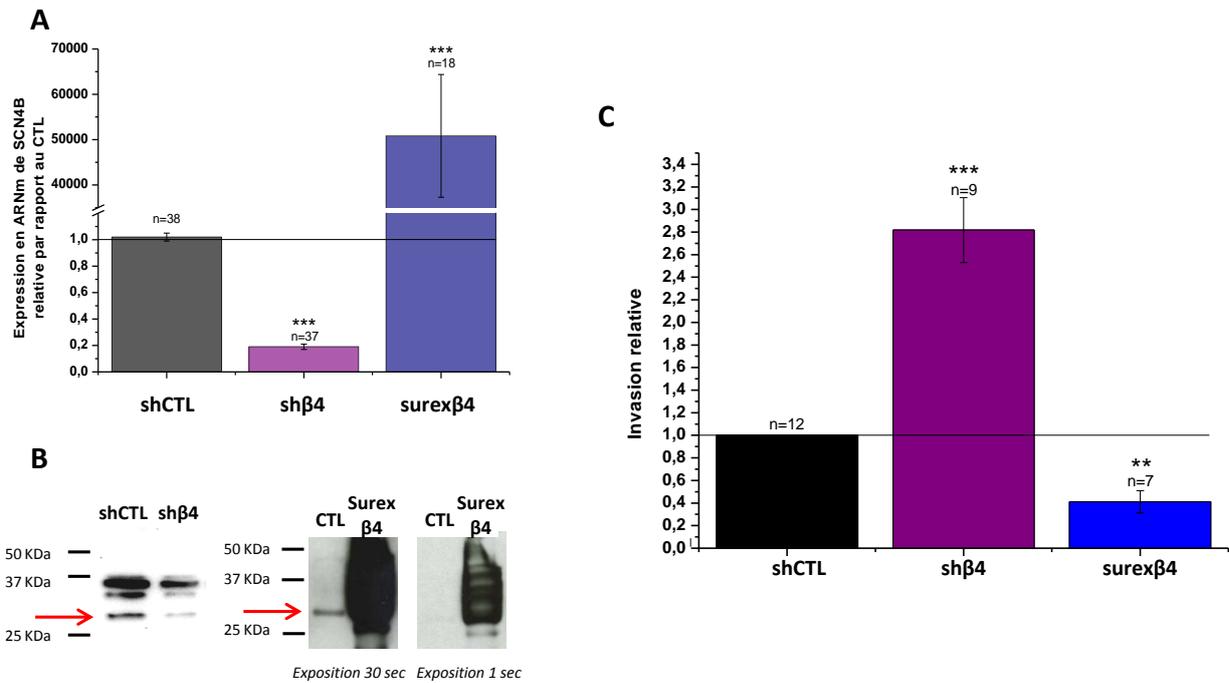
**Figure 34 :** Effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  par un siRNA sur le développement de l'invasivité *in vivo* chez l'embryon de poisson zèbre.

Juste avant l'injection, les cellules sont au préalable colorées par un marqueur fluorescent, le CM-Dil (Molecular Probe, Fisher). Les cellules ayant colonisé les organes sont comptées 72h après leur injection dans la cavité vitelline. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'embryons porteurs de 3 micrométastases ou plus (représentation de la moyenne  $\pm$  sem). Statistiquement différent à \*\*  $p < 0,01$  par rapport à la condition siCTL (test de Student).

Afin de compléter ce modèle animal nous avons fait une nouvelle étude chez la souris (NMRI nude). Afin de maintenir une inhibition continue de la protéine  $\beta 4$  au cours de l'étude chez la souris, nous avons créé des lignées cellulaires MDA-MB-231 modifiées génétiquement pour ne pas exprimer ou

surexprimer la protéine  $\beta 4$ . Pour la lignée n'exprimant plus  $\beta 4$ , les cellules MDA-MB-231-Luc (exprimant la luciférase) ont été transduites avec des particules virales contenant une séquence codant pour un shRNA ciblant spécifiquement les ARNm de  $\beta 4$  ainsi que le gène de la GFP qui permet une discrimination des cellules transduites (MDA-MB-231-sh $\beta 4$ ). De la même façon, une lignée surexprimant le gène de  $\beta 4$  a été créée (MDA-MB-231-surex $\beta 4$ ) en transduisant les cellules MDA-MB-231-Luc avec des particules lentivirales contenant une séquence de surexpression de  $\beta 4$ . Des cellules témoins (MDA-MB-231-shCTL) ont été transduites avec des particules virales contenant seulement le gène de la GFP.

L'effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans ces cellules modifiées génétiquement (MDA-MB-231-shCTL, MDA-MB-231-sh $\beta 4$ , MDA-MB-231-surex $\beta 4$ ) sur l'expression en ARNm (figure 35 A), sur l'expression protéique (figure 35 B) ainsi que sur l'invasivité (figure 35 C) a été caractérisé. Le shRNA dirigé contre les ARNm du gène *SCN4B* (MDA-MB-231-sh $\beta 4$ ) diminue la quantité des ARNm de  $\beta 4$  d'environ  $81 \pm 11$  % (figure 35 A) et la surexpression du gène *SCN4B* entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm de 50 000 fois (figure 35 A) par rapport aux cellules shCTL (témoin, CTL). Ces effets sur la quantité (augmentation ou diminution) d'ARNm conduit également à une diminution (sh $\beta 4$ ) ou une augmentation (surex $\beta 4$ ) de la protéine (figure 35 A). L'invasivité *in vitro* de ces lignées, présentée dans la figure 35 B, indique que l'invasivité des cellules n'exprimant plus la protéine  $\beta 4$  (sh $\beta 4$ ) est presque triplée par rapport aux cellules shCTL qui exprime  $\beta 4$  servant de témoin (augmentation de  $180 \pm 10$  %). A l'inverse, la surexpression de  $\beta 4$  (surex $\beta 4$ ) diminue l'invasivité cellulaire de  $60 \pm 25$  %.

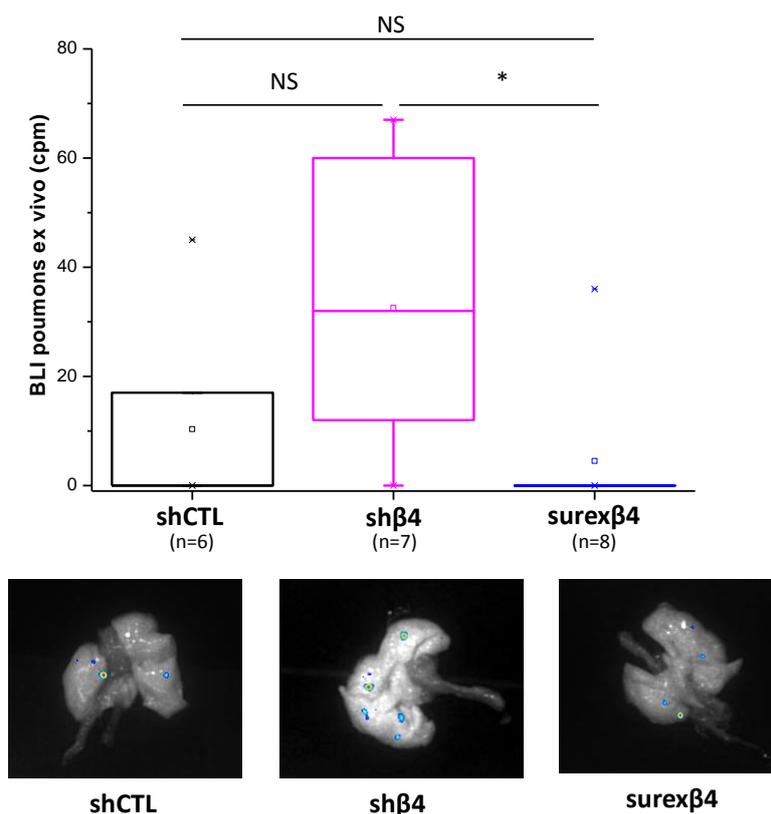


**Figure 35 :** Effet de la surexpression ou de l'inhibition de l'expression du gène *SCN4B* codant pour la protéine β4 sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales contenant soit une séquence codant pour un shRNA qui inhibera spécifiquement l'expression du gène *SCN4B*, soit une séquence codant pour l'expression du gène *SCN4B* et surexprimant la protéine β4. La lignée MDA-MB-231-shCTL a été transduite avec une séquence qui permet l'expression d'un shRNA qui ne cible aucun ARNm. A, La quantité d'ARNm de chaque lignée a été vérifiée par PCR semi-quantitative et B, la quantité de protéine par western blot. C, Les capacités d'invasivité des cellules ont été testées sur des inserts d'invasion pendant 24h. Représentation de la moyenne ± sem. Statistiquement différent à \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport au témoin (test de Student).

Ces résultats confirment donc l'effet de l'inhibition d'expression (par shRNA) ou de la surexpression de l'expression de la protéine β4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Ces modifications par shβ4 ou surexβ4 étant stables, nous avons pu utiliser ces lignées pour les expérimentations animales suivantes.

Nous avons utilisé un modèle de colonisation métastatique après une injection de cellules cancéreuses dans la veine caudale de souris immunodéprimées. Trois groupes de souris ont été établis : le premier groupe a reçu une injection de cellules MDA-MB-231-shCTL (n = 6 souris), le second groupe a reçu une injection de cellules n'exprimant plus la protéine β4, MDA-MB-231-shβ4 (n = 7 souris), et le troisième groupe a reçu une injection de cellules surexprimant la protéine β4, MDA-MB-23-surexβ4 (n = 8 souris). La bioluminescence des cellules a été suivie *in vivo* chaque semaine pendant 8 semaines. La bioluminescence *ex vivo* des différents organes (foie, reins, rate, poumons, cerveau, os des pattes, du rachis et des côtes) a été analysée. Seuls les poumons montrent une bioluminescence qui est représentée dans la figure 36.



**Figure 36 :** Analyse de la bioluminescence des poumons de souris *ex vivo* en fonction de l'expression de la protéine  $\beta 4$ .

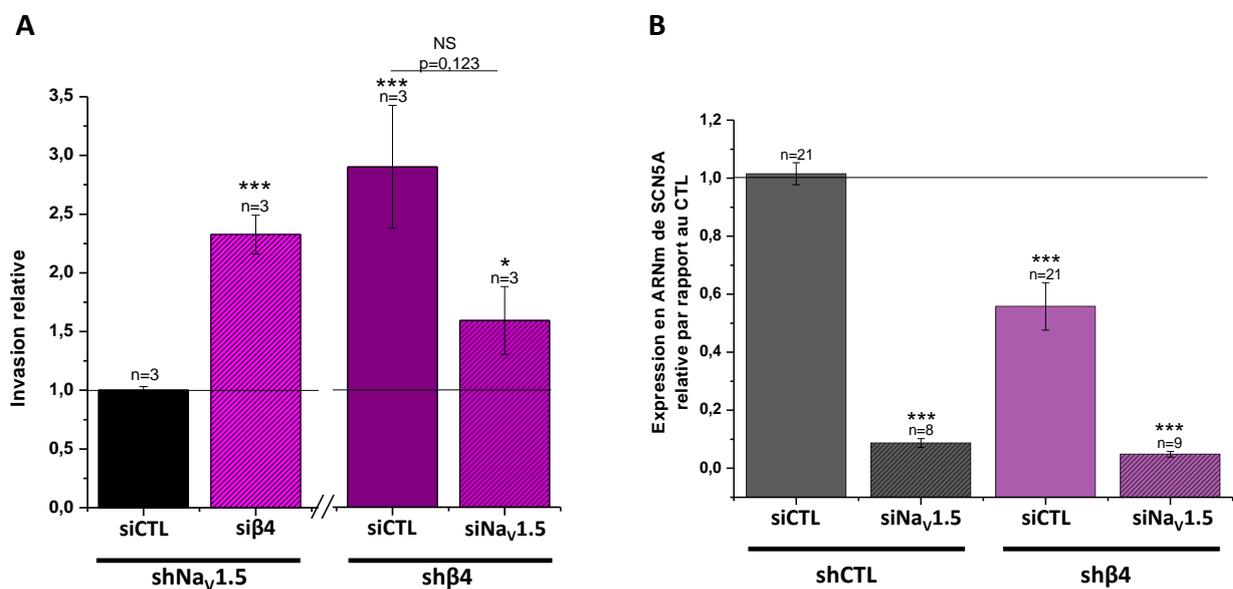
Le sacrifice de l'animal a été effectué 8 semaines après l'injection des cellules MDA-MB-231 (shCTL, sh $\beta 4$  ou surex $\beta 4$ ) dans la veine caudale de souris immunodéprimées NMRI nude. Le rectangle représente la dispersion des valeurs du 25<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> percentile (exprimées en cpm) et la médiane est indiquée par la ligne dans ce rectangle. Les valeurs extrêmes sont indiquées par les croix. La moyenne est représentée par le carré. NS statistiquement non significatif. Statistiquement significatif à \*  $p < 0.05$  (test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison par le test de Dunn).

L'analyse *ex vivo* des poumons prélevés montre que lorsque les cellules n'expriment plus la protéine  $\beta 4$ , la bioluminescence semble augmentée par rapport aux souris ayant reçu une injection de cellules CTL. A l'inverse, lorsque les cellules surexpriment la protéine  $\beta 4$ , la bioluminescence semble diminuée. Une bioluminescence *ex vivo* est présente dans les poumons de 2 souris sur 6 dans le groupe shCTL, 1 souris sur 8 dans le groupe surex $\beta 4$ , et de 6 souris sur 7 dans le groupe sh $\beta 4$ . Ces résultats sont encourageants mais cette étude demande à être répétée afin d'augmenter le nombre de souris développant des foyers tumoraux. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier la capacité d'installation tumorale ainsi que la vitesse de développement d'une tumeur à la suite d'une injection sous-cutanée des cellules génétiquement modifiées. De plus, une expression et/ou une activité trop faible de la luciférase peuvent également être à l'origine de la faible détection de la bioluminescence *in vivo* et *ex vivo*. Il serait donc intéressant de transduire à nouveau les cellules MDA-MB-231 (shCTL, sh $\beta 4$  ou surex $\beta 4$ ) avec le gène de la luciférase pour tenter d'augmenter la bioluminescence *in vivo*.

La protéine  $\beta 4$  étant une sous-unité auxiliaire des canaux  $\text{Na}_v$ , nous avons voulu savoir si son effet sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231 dépendait d'une régulation de l'activité de  $\text{Na}_v1.5$ . Nous avons émis l'hypothèse que la diminution de l'expression de  $\beta 4$  pourrait augmenter l'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$ . Cette augmentation d'activité de  $\text{Na}_v1.5$  favoriserait ainsi la cascade d'évènements précédemment décrite, c'est-à-dire : régulation allostérique de l'activité de NHE-1 par  $\text{Na}_v1.5$ , acidification extracellulaire, augmentation de l'activité des cathepsines à cystéine et augmentation de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire.

#### 4. Implication de la sous-unité $\beta 4$ dans le contrôle de l'invasivité cellulaire

Afin de déterminer si l'effet de la sous-unité  $\beta 4$ , sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231, passait par une régulation des canaux  $\text{Na}_v1.5$ , nous avons utilisé la lignée MDA-MB-231 n'exprimant plus les canaux  $\text{Na}_v1.5$  (sh $\text{Na}_v1.5$ ) ou bien le siRNA dirigé contre l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  (si $\text{Na}_v1.5$ ). L'invasivité des cellules MDA-MB-231 a été testée en inhibant, en même temps, l'expression des deux protéines (sous-unité  $\beta 4$  et  $\text{Na}_v1.5$ ) (figure 37).



**Figure 37** : Rôle de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

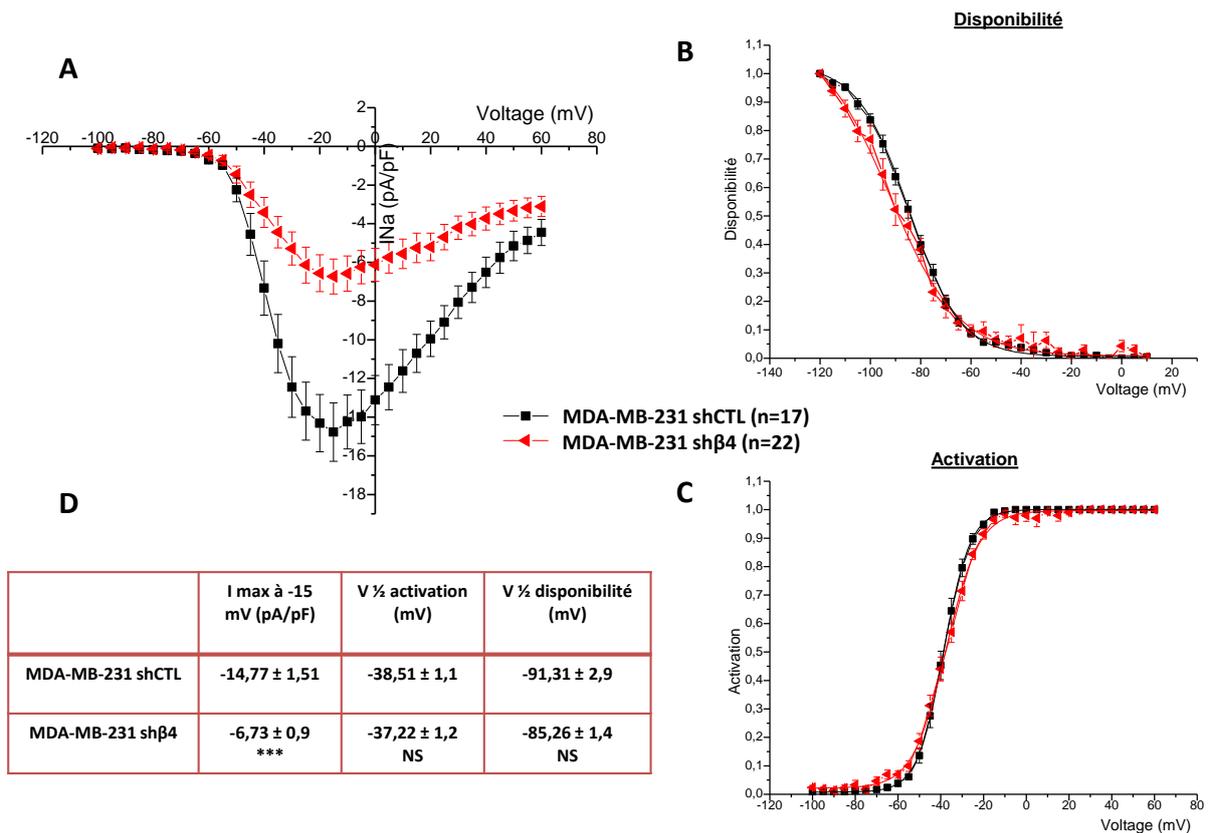
A, Les cellules sh $\text{Na}_v1.5$  ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre l'expression du gène *SCN4B* (si $\beta 4$ ) 48h avant d'être ensemencées sur les inserts d'invasion. Les cellules sh $\beta 4$  ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre l'expression du gène *SCN5A* (si $\text{Na}_v1.5$ ) 24h avant d'être ensemencées sur les inserts. Un siCTL sert de témoin de transfection et contient une séquence ne ciblant aucun ARNm. Les capacités d'invasivité des cellules ont ensuite été testées pendant 24h et relativisées par rapport à celles des cellules shCTL (CTL). B, L'expression en ARNm de  $\text{Na}_v1.5$  a été évaluée par qPCR dans chaque lignée. Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. Statistiquement différent à \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  par rapport au shCTL, ###  $p < 0,001$  par rapport au sh $\text{Na}_v1.5$  siCTL (test de Mann-Whitney).

L'inhibition transitoire de l'expression de  $\beta 4$  (par siRNA) augmente l'invasivité des cellules MDA-MB-231-shNa<sub>v</sub>1.5 (environ  $131 \pm 10 \%$ ) (Figure 37 A), dans les mêmes proportions que les cellules sh $\beta 4$  (sh $\beta 4$ ) (figure 36 B). De plus, dans les cellules sh $\beta 4$  qui n'expriment plus la protéine  $\beta 4$ , l'inhibition transitoire de l'expression de Na<sub>v</sub>1.5 (grâce à un siRNA) diminue une partie ( $41 \pm 18 \%$ ) de l'invasion augmentée par la suppression de  $\beta 4$ . Il serait cependant nécessaire d'augmenter le nombre d'expériences afin de déterminer si cette différence est statistiquement significative.

Le rôle de la sous-unité  $\beta 4$  dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 semble donc être indépendant des canaux Na<sub>v</sub>1.5. En effet lorsque l'expression de  $\beta 4$  est inhibée, l'invasivité est toujours augmentée en présence ou non de Na<sub>v</sub>1.5, et l'inhibition de Na<sub>v</sub>1.5 ne réduit qu'une partie de l'invasivité. Nous avons cependant voulu confirmer cette hypothèse en étudiant l'effet de l'inhibition de l'expression de  $\beta 4$  sur la voie Na<sub>v</sub>1.5/NHE-1.

## **5. Rôle de la sous-unité $\beta 4$ sur l'activité de Na<sub>v</sub>1.5 et de l'échangeur NHE-1**

La protéine  $\beta 4$  étant décrite comme une sous-unité régulatrice des canaux Na<sub>v</sub>, nous avons voulu étudier dans un premier temps l'influence de l'inhibition de son expression sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231. Le courant ainsi que les propriétés d'activation et de disponibilité en fonction du voltage membranaire ont donc été caractérisés par des études électrophysiologiques représentées dans la figure 38.

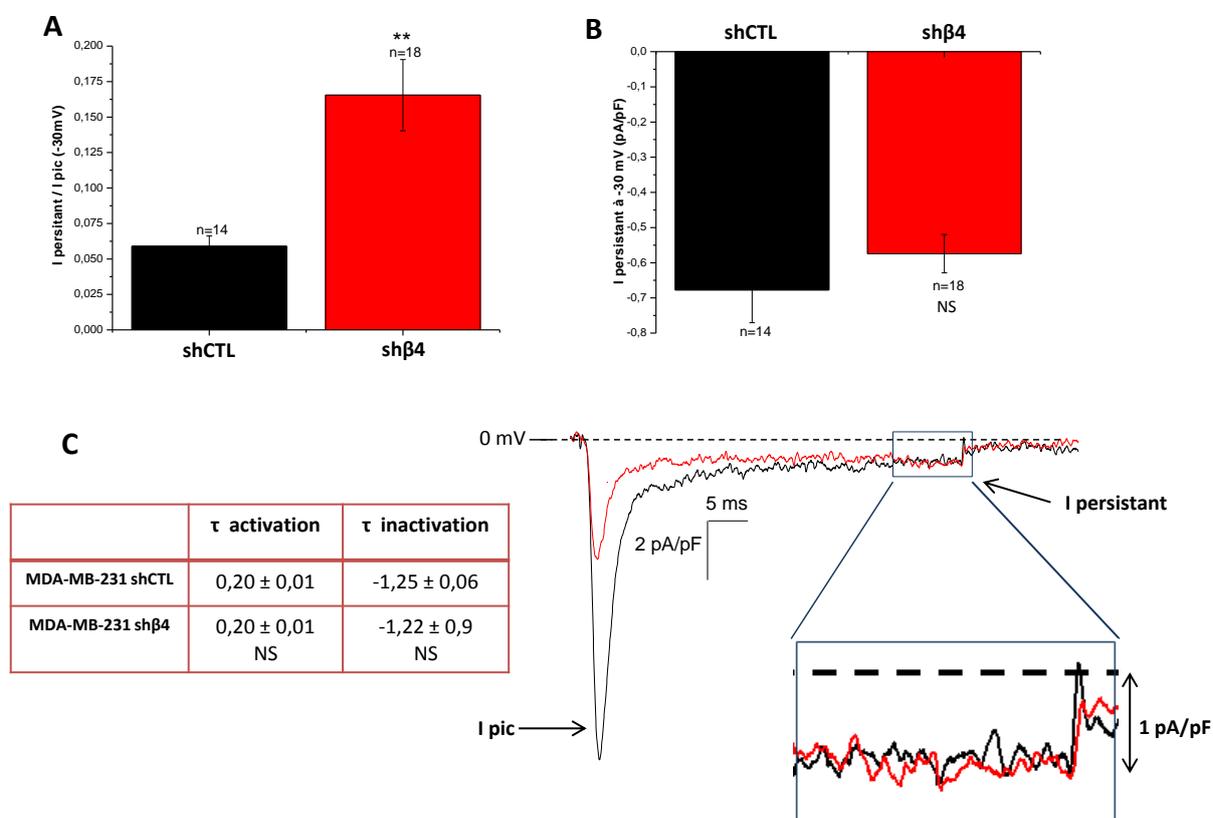


**Figure 38:** Influence de l'extinction de la sous-unité  $\beta 4$  sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231.

A, Relation courant-voltage ( $I_{Na}/V$ ). B, Disponibilité et C, activation des canaux  $Na_V$  en fonction du voltage membranaire. n : nombre de cellules étudiées. D, Tableau récapitulatif du courant maximal ( $I_{max}$ ) à -15 mV, et des voltages de demi-activation ou demi-disponibilité en condition témoin (shCTL) ou sh $\beta 4$ . NS : statistiquement non significatif. Statistiquement significatif à \*\*\* $p < 0.001$  (test de Mann-Whitney). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem.

Des études menées sur l'effet de la sous-unité  $\beta 4$  sur l'activité des canaux  $Na_V$  ont montré que des mutations de  $\beta 4$  étaient corrélées principalement à une augmentation du courant persistant des  $Na_V$  (Aman TK et al. 2009 ; Bant JS et al. 2010). Dans notre étude, la relation courant-voltage ( $I_{Na}-V$ ) montre que la densité de courant diminue lorsque la sous-unité  $\beta 4$  n'est plus exprimée. La densité de courant mesurée pour une dépolarisation à -15 mV est de  $-14,8 \pm 1,5$  pA/pF en condition témoin (shCTL) contre  $-6,7 \pm 0,9$  pA/pF lorsque l'expression de  $\beta 4$  est inhibée (sh $\beta 4$ ). Cela représente une diminution d'environ 55 % de la densité de courant maximal dans les cellules MDA-MB-231-sh $\beta 4$ . Cette observation pourrait correspondre à la diminution de la quantité en ARNm de *SCN5A* observée dans la lignée MDA-MB-231-sh $\beta 4$  (figure 37, B) et/ou à une diminution de l'adressage membranaire de la protéine  $Na_V1.5$ . Les courbes représentées à droite (figure 38 B et C) montrent l'effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  sur l'activation et la disponibilité des canaux sodiques en fonction du voltage membranaire. L'absence de la protéine  $\beta 4$  ne semble pas modifier l'activation en fonction du voltage des canaux  $Na_V$ , mais entraîne en revanche un léger déplacement (non significatif) de la courbe de disponibilité vers des potentiels hyperpolarisés (voltage de demi-

activation de  $-91,31 \pm 2,9$  mV et de  $-85,26 \pm 1,4$  mV en condition shCTL et sh $\beta$ 4 respectivement). L'étude du courant persistant des canaux  $\text{Na}_v$  pour un potentiel imposé de -30 mV a été menée et les résultats sont présentés dans la figure 39.

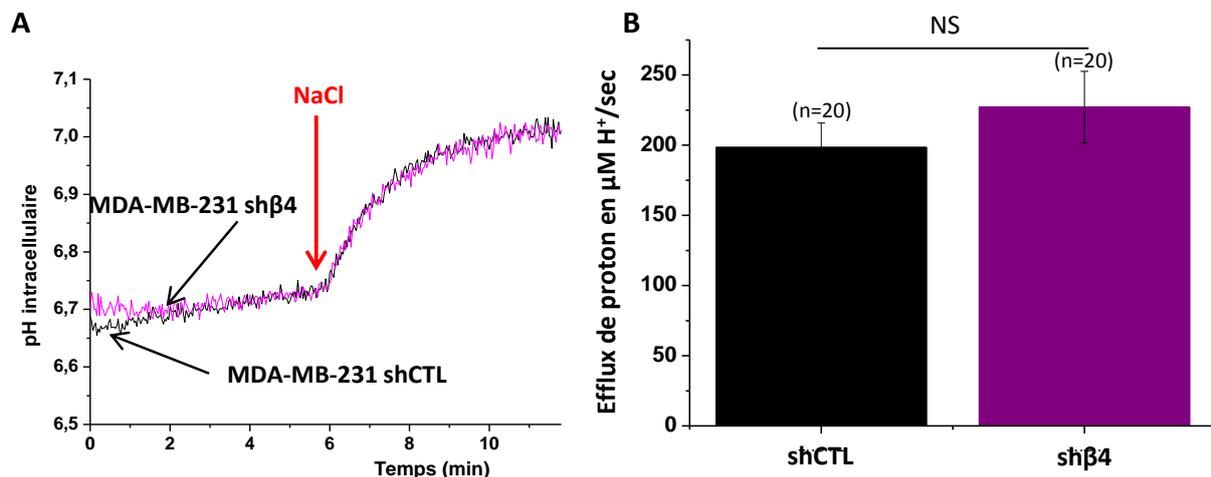


**Figure 39 :** Influence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta$ 4 sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231.

Analyse du courant persistant mesuré lors d'une dépolarisation de -100 mV à -30 mV. La valeur moyenne du courant est calculée sur les 10 dernières ms du protocole (de 40 à 50 ms). A, représentation du courant persistant ( $I_{\text{persistant}}$ ) relativisé par rapport au courant de pic ( $I_{\text{pic}}$ ). B, Moyenne du courant persistant obtenue dans chaque lignée. C, courbes représentatives du courant  $I_{\text{Na}}$  des cellules shCTL (courbe noire) et sh $\beta$ 4 (courbe rouge) suite à une dépolarisation à -30 mV pendant 50 ms. Les cinétiques ( $\tau$ ) d'activation et d'inactivation ont été calculées ( $n=18$  cellules étudiées). L'équation de Boltzman a été utilisée pour la cinétique d'activation. L'équation d'une exponentielle croissante a été utilisée pour la cinétique d'inactivation rapide.  $n$  : nombre de cellules analysées. NS : non statistiquement différent. Statistiquement différent à \*\*  $p < 0,01$  par rapport au témoin (test de Mann-Whitney). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem.

L'analyse du courant sodique persistant en fonction de l'amplitude maximale du courant de pic, représentée dans la figure 39 A, montre une augmentation du courant persistant par rapport au courant de pic ( $I_{\text{pic}}$ ) lorsque l'expression de la sous-unité  $\beta$ 4 est inhibée. Cependant l'étude de la valeur absolue des courants sodiques persistants, enregistrés à -30 mV, ne montre pas de différence significative en présence ou non de la protéine  $\beta$ 4 (figure 39 B). On observe cependant une augmentation de l'activité des canaux générant un courant persistant plus important. Ainsi, en présence ou non de la sous-unité  $\beta$ 4 l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  semble identique au potentiel de membrane des cellules.

Le rôle de la sous-unité  $\beta 4$  dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 semble donc être indépendant d'un effet sur l'activité de  $\text{Na}_v1.5$ . En effet, comme les cellules sh $\beta 4$  augmentent l'invasivité on aurait pu s'attendre à une augmentation du courant sodique persistant mais ce n'est pas le cas dans l'absolu. Dans la régulation de l'invasivité, l'échangeur sodium-proton NHE-1 joue également un rôle important car son activité induit une acidification périmembranaire favorable à l'activité des cathepsines et donc favorable à la dégradation de la matrice extracellulaire. Nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  l'activité de l'échangeur NHE-1 par des mesures de spectrofluorimétrie (figure 40). La mesure du  $\text{pH}_i$  (par la sonde BCECF sensible au  $\text{pH}$ ) a été réalisée sur des cellules acidifiées (par la technique de "pulse wash" de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). L'efflux de protons est mesuré lors de l'ajout de  $\text{NaCl}$  dans le milieu extracellulaire qui était auparavant maintenu dépourvu de  $\text{Na}^+$ . Cette étude ne montre aucun effet de l'inhibition de l'expression de  $\beta 4$  sur l'efflux de protons.



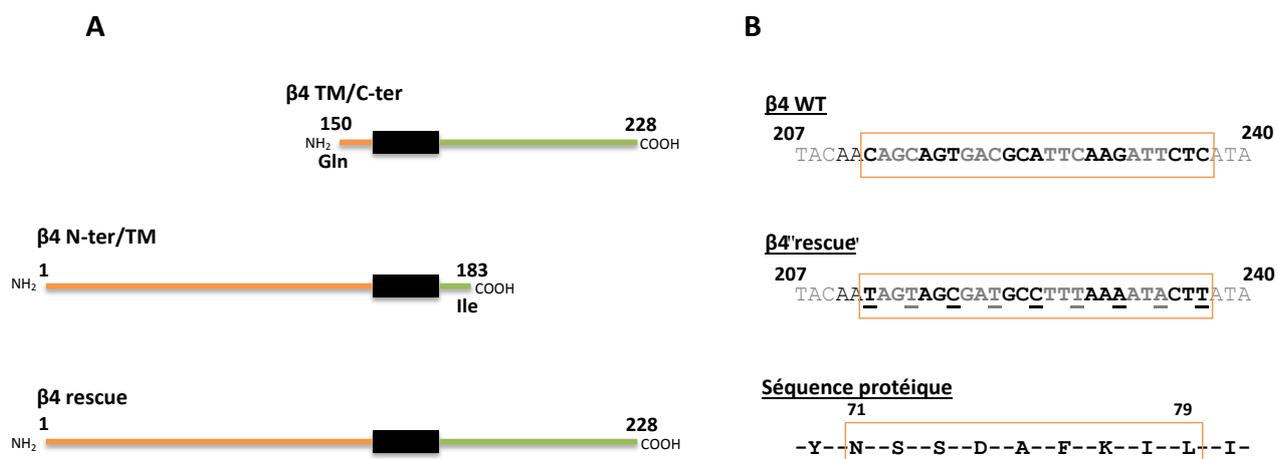
**Figure 40 :** Mesure de l'efflux de protons en fonction de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$ .

Les cellules MDA-MB-231-shCTL (CTL) et MDA-MB-231-sh $\beta 4$  (sh $\beta 4$ ) sont remises en suspension et sont chargées avec une sonde fluorescente sensible aux variations de  $\text{pH}$  intracellulaire (BCECF). Les cellules ont ensuite été acidifiées avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 3 min avant d'être lavées pour éliminer le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  extracellulaire puis placées dans une solution sans sodium. A, L'ajout de sodium dans le milieu extracellulaire permet alors de mesurer la vitesse d'efflux de protons. B, L'efflux de protons exprimé en  $\mu\text{M H}^+/\text{sec}$  est calculé par le produit de la vitesse d'efflux ( $V_i$ ) et du pouvoir tampon ( $\beta_i$ ). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. NS : non statistiquement différent  $P=0,263$  (test de Wilcoxon) ; n : nombre d'expériences.

L'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine  $\beta 4$  sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231 semble donc indépendant de la voie  $\text{Na}_v1.5$  / NHE-1 puisque l'inhibition de l'expression de la protéine  $\beta 4$  n'augmente pas l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  ou de NHE-1 dans ces cellules.

## 6. Rôles des différents domaines protéiques de la sous-unité $\beta 4$ sur l'invasivité cellulaire

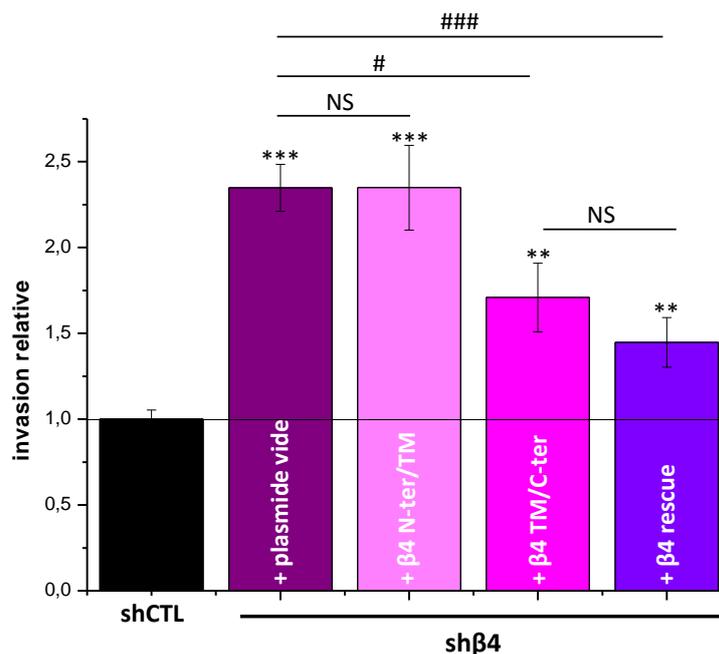
Des rôles spécifiques ont été attribués aux différentes parties de la protéine (extracellulaire, transmembranaire ou intracellulaire). En effet, la boucle extracellulaire des sous-unités  $\beta$  semble impliquée dans des interactions entre cellules (adhésions homo- ou hétérophiles) ou avec des molécules de la matrice extracellulaire (contactine, N-cadhérine, tenascine-R ...) (Brackenbury, 2012). La partie intracellulaire est quant à elle associée au recrutement d'ankyrine (Malhotra et al., 2000), une protéine permettant la liaison entre des protéines membranaires et le cytosquelette, et potentiellement à la kinase Fyn de la famille des kinases Src (Brackenbury et al., 2008), qui sont activées par la voie de signalisation intégrines / Ras. Nous avons donc voulu étudier plus précisément l'implication des différents domaines de la protéine  $\beta 4$  dans l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Pour cela, les cellules n'exprimant plus  $\beta 4$  (sh $\beta 4$ ) ont été transfectées avec différents plasmides contenant des séquences codant pour une protéine  $\beta 4$  tronquée (figure 41) ou une protéine  $\beta 4$  entière mais dont l'ADN codant est un mutant silencieux non ciblé par le shRNA.



**Figure 41:** Schéma des séquences codant pour les protéines  $\beta 4$  tronquées ou entière dont non reconnues par le shRNA.

A, Représentation schématique des séquences protéiques de la protéine  $\beta 4$  comprenant un domaine N-terminal extracellulaire (orange), un segment transmembranaire (TM, rectangle noir) et un domaine C-terminal intracellulaire (vert). Les différentes séquences représente la protéine  $\beta 4$  totale ( $\beta 4$  rescue), tronquée en extracellulaire du résidu 1 au résidu 149 ( $\beta 4$  TM/C-ter) ou tronquée en intracellulaire du résidu 184 au résidu 228 ( $\beta 4$  N-ter/TM). B, Séquence nucléotidique du gène *SCN4B* sauvage ( $\beta 4$  WT) ou muté ( $\beta 4$  rescue). La séquence nucléotidique reconnue par le shRNA (sh $\beta 4$ ) est indiquée par le cadre orange et les mutations silencieuses ont été soulignées. La séquence en acides aminés (du résidu 71 au résidu 79) n'est pas modifiée. La même mutation silencieuse a été introduite dans le mutant N-ter/TM afin de le protéger de l'action du shRNA.

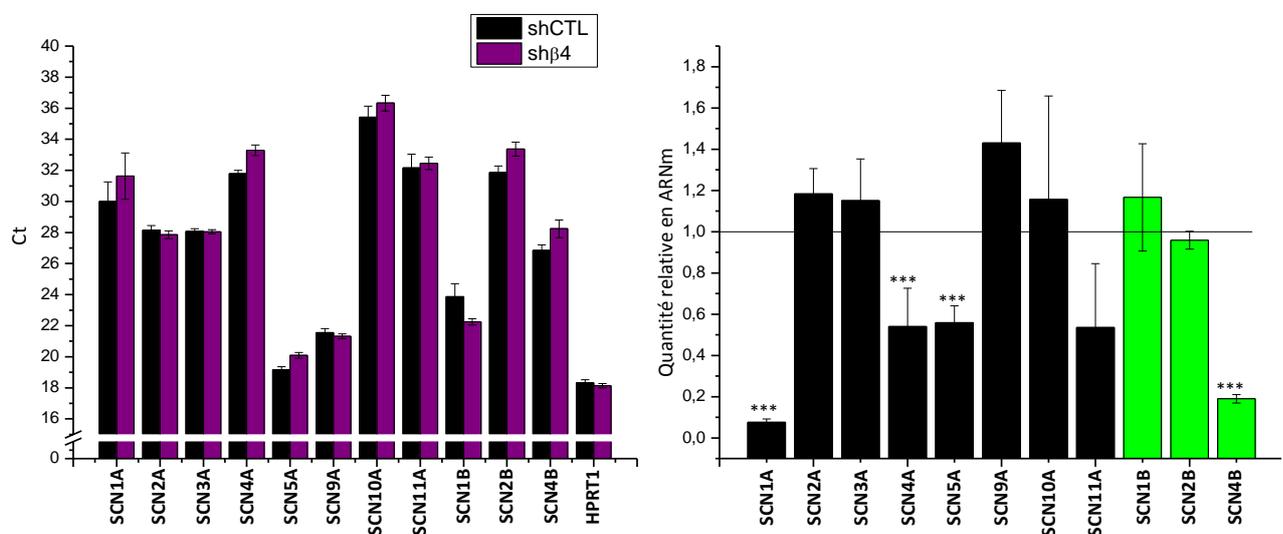
Un premier plasmide code pour une protéine  $\beta 4$  tronquée en extracellulaire ( $\beta 4$  N-ter/TM ; perte des acides aminés 1 à 149), un second code pour une protéine  $\beta 4$  tronquée en intracellulaire ( $\beta 4$  TM/C-ter ; perte acides aminés 184 à 228) et le troisième code pour la protéine  $\beta 4$  entière ( $\beta 4$  rescue). Dans le mutant "rescue" et "N-ter/TM", les séquences nucléotidiques ont été modifiées par des mutations silencieuses dans la partie ciblée par le shRNA (sh $\beta 4$ ) afin que les ARNm ne soient pas reconnus et détruits par le shRNA sh $\beta 4$ . L'invasivité testée dans chacune de ces conditions est représentée dans la figure 42.



**Figure 42 :** Rôle des différents domaines de la protéine  $\beta 4$  sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été transfectées 24h avant d'être ensemencées sur les inserts d'invasion. Les capacités d'invasivité des cellules ont ensuite été testées pendant 24h. Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. n = 6 expériences ; statistiquement différent à \*\*\*/### p<0,001, \*\* p<0,01, # p<0,05 par rapport aux cellules shCTL (\*) ou sh $\beta 4$  (#) (test de Student).

L'analyse de l'invasivité cellulaire en fonction des différents fragments de  $\beta 4$  montre que l'expression de la partie extracellulaire de la protéine ( $\beta 4$  N-ter/TM) n'a pas d'effet sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231-sh $\beta 4$ . A l'inverse l'expression du domaine intracellulaire de la protéine  $\beta 4$  ( $\beta 4$  TM/C-ter) réduit en partie ( $47,4 \pm 11,7$  %) l'invasivité due à l'absence de la protéine  $\beta 4$ . Ceci soulève donc l'importance des parties transmembranaire et intracellulaire de la sous-unité  $\beta 4$  sur le contrôle des propriétés invasives des cellules MDA-MB-231. L'expression de la protéine totale ( $\beta 4$  "rescue" produite grâce à une mutation silencieuse qui rend l'ARN insensible au sh $\beta 4$ ) ne réduit pas en totalité l'invasivité induite par l'inhibition de l'expression de  $\beta 4$  mais la diminue de  $66,7 \pm 10,0$  %. Dans la séquence nucléotidique de  $\beta 4$  "rescue", seulement neuf acides aminés ont été mutés.

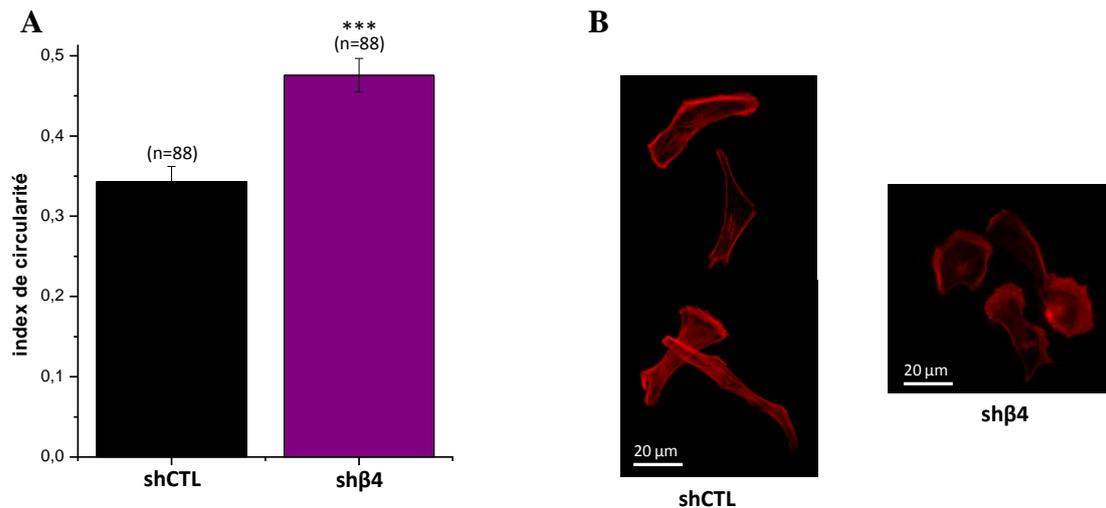
La partie intracellulaire de  $\beta 4$  pourrait interagir directement avec le cytosquelette et avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires qui réduisent l'invasivité. Le domaine extracellulaire seul de  $\beta 4$  ne réduit pas l'invasivité. A l'inverse, la partie intracellulaire réverse en partie l'invasivité induite par l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$ . On ne peut cependant pas écarter l'hypothèse selon laquelle le domaine extracellulaire de la protéine  $\beta 4$  entière puisse moduler l'invasivité par l'induction d'un changement de conformation du domaine intracellulaire. Nous pourrions pour cela faire des études de mutagenèse dirigée sur les résidus conservés la partie N-ter de  $\beta 4$ . Il serait par exemple intéressant de muter les cystéines (Cys21 et Cys98) intervenant dans la formation du pont disulfure de la boucle "Ig-like" extracellulaire. Les sites de clivages enzymatiques par les sécrétases pourraient également être mutés pour observer le rôle de ces enzymes sur l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Enfin, des résultats préliminaires, présentés figure 43 et obtenus par PCR semi-quantitative, montrent qu'il pourrait exister une modulation de la quantité d'ARNm des isoformes de  $N_{aV}$  et de  $\beta$  lorsque l'expression de  $\beta 4$  est inhibée. Il serait nécessaire de poursuivre cette analyse et d'étudier l'expression et l'adressage membranaire des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .



**Figure 43 :** Expression des gènes des différentes isoformes des sous-unités principales  $\alpha$  de  $N_{aV}$  et des sous-unités régulatrices  $\beta$  dans les cellules MDA-MB-231-shCTL et MDA-MB-231-sh $\beta 4$ .

A, La quantité d'ARNm des cellules MDA-MB-231-shCTL et MDA-MB-231-sh $\beta 4$  exprimée en valeur de Ct déterminé par PCR semi-quantitative (qPCR). B/ Quantité d'ARNm dans les cellules MDA-MB-231-sh $\beta 4$  relativisée par rapport au gène de référence (HPRT1) et par rapport aux cellules MDA-MB-231-shCTL. Les ARNm des gènes *SCN8A* et *SCN3B* sont très faiblement ou pas exprimés et n'ont pas pu être amplifiés par 40 cycles de PCR. Statistiquement significatif à  $***p < 0,001$  (test Mann-Whitney). Représentation de la moyenne  $\pm$  sem,  $n = 3$  à 6 expériences.

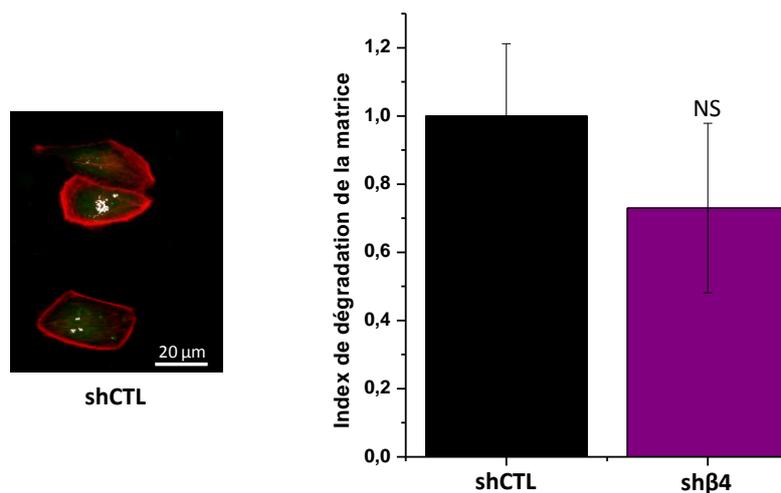
Afin de savoir si la protéine  $\beta 4$  est impliquée dans un changement phénotypique des cellules, nous avons caractérisé leur forme par le calcul d'un index de circularité (Figure 44) à partir d'images d'épifluorescence de cellules MDA-MB-231 ensemencées sur matrigel. Le cytosquelette d'actin-F a été marqué à la phalloïdine-AlexaFluor 594 nm. Lorsque l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  est inhibée, les cellules MDA-MB-231 deviennent plus circulaires, suggérant que le cytosquelette d'actine est modifié.



**Figure 44 :** Effet de l'inhibition de l'expression ou de la surexpression de la protéine  $\beta 4$  sur la circularité des cellules MDA-MB-231.

A, L'index de circularité a été calculé à l'aide du logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, National Institute of Health, USA). B, Image représentative des cellules MDA-MB-231-shCTL et MDA-MB-231-sh $\beta 4$ . Le marquage rouge correspond au cytosquelette d'actin-F marqué à la phalloïdine-AlexaFluor 594 nm. Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. n : nombre de cellules étudiées. Statistiquement différent à \*\*\* p < 0,001 (test de Student).

Lorsque l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  est inhibée, les cellules deviennent plus rondes et il semble y avoir une réorganisation du cytosquelette d'actin-F des cellules. Des études d'immunoprécipitation pourront être réalisées afin d'observer des interactions potentielles entre la sous-unité  $\beta 4$  et des protéines de la famille des kinases Src (Fyn par exemple) ou des ankyrines. La circularité des cellules qui n'expriment plus la protéine  $\beta 4$  pourrait apparaître comme un phénotype de cellules moins agressives, ce qui serait contraire aux résultats obtenus sur l'invasivité. Afin de voir si l'inhibition de la sous-unité  $\beta 4$  pouvait entraîner une augmentation de l'activité protéolytique des cellules nous avons réalisé une étude préliminaire de microscopie à fluorescence en analysant la dégradation d'un substrat (la DQ-gélatine) par les cellules ensemencées sur Matrigel (Figure 45). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$ , bien qu'elle augmente l'invasivité des cellules, n'augmente pas la protéolyse de la matrice extracellulaire.



**Figure 45 :** Activité protéolytique des cellules MDA-MB-231.

Les cellules sont ensemencées sur du matrigel contenant de la DQ-gélatine. Lorsque ce substrat est dégradé il émet une fluorescence verte. L'actine est détectée par la phalloïdine-AF 594 nm (rouge). La colocalisation entre ces points de dégradation de la DQ-Gelatin (vert) et les points de condensation d'actine (rouge) est représentée en blanc sur l'image représentative de la dégradation de la matrice par les cellules shCTL. Les pixels blancs, correspondant à cette colocalisation, sont quantifiés dans chacune des conditions (shCTL et shβ4) puis relativisés par rapport à la condition shCTL. Représentation de la moyenne  $\pm$  sem (n = 3 expériences indépendantes). NS non statistiquement différent (test de Mann-Whitney).

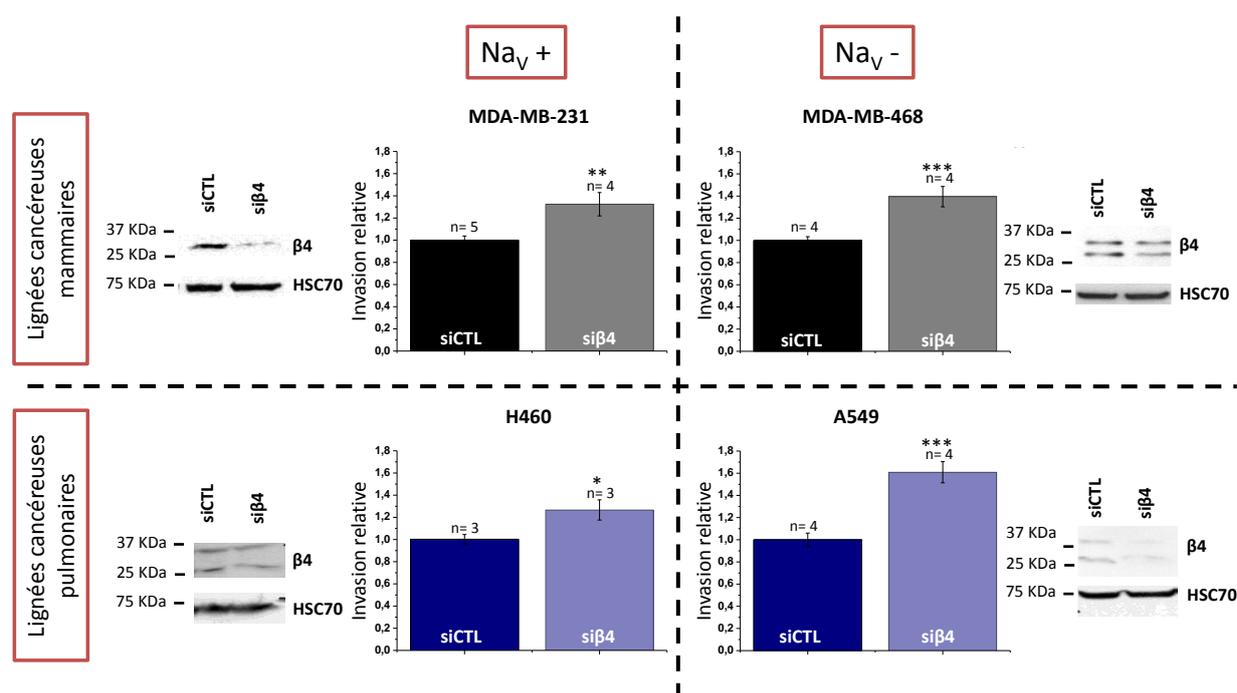
Il a récemment été décrit une transition cellulaire nommée Mésoenchymo-Amiboïde. Au cours de cette transition, les cellules cancéreuses acquièrent de nouvelles propriétés qui leur confèrent un plus grand pouvoir invasif notamment grâce à un mode d'invasion non protéolytique nommé "amiboïde". Dans ce type d' invasion les cellules présentent une morphologie plus arrondie (Friedl et al., 2004; Pankova et al., 2010). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'inhibition de l'expression de la sous-unité β4 favorise la transition Mésoenchymo-Amiboïde des cellules cancéreuses.

Une étude par microscopie électronique à balayage pourrait donc être faite sur nos cellules MDA-MB-231 exprimant (shCTL) ou non (shβ4) la protéine β4. Les structures et marqueurs spécifiques de chaque type d'invasion pourraient alors être observés : des cellules allongées avec des filopodes seraient caractéristiques d'une invasion protéolytique mésoenchymateuse alors que des cellules plus rondes avec des bourgeonnements membranaires seraient caractéristiques d'une invasion amiboïde. De plus, la transition vers une invasivité amiboïde nécessite l'activation de la voie des petites protéines G RhoA contrairement à l'invasion de type mésoenchymateux qui nécessite majoritairement l'activation de la voie Rac1 ou Cdc42. L'activation de ces différentes voies doit également être vérifiée dans nos deux lignées cellulaires.

## 7. Implication de la protéine $\beta 4$ dans l'invasivité d'autres cellules cancéreuses humaines

Nous avons cherché à savoir si l'effet de l'inhibition de la sous-unité  $\beta 4$  sur l'invasivité existait dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses humaines, qu'elles possèdent des courant sodiques ou non. Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-468 sont moins invasives que les cellules MDA-MB-231 et n'ont pas de courant sodique (Roger et al., 2003). Elles expriment les quatre sous-unités  $\beta$ . Les cellules cancéreuses pulmonaires H460 ont un courant sodique (Campbell et al., 2013; Roger et al., 2007) et expriment les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 4$ . Les cellules A549 sont également des cellules cancéreuses pulmonaires qui expriment les quatre sous-unités mais ne présentent pas de courant sodique (Roger et al., 2007).

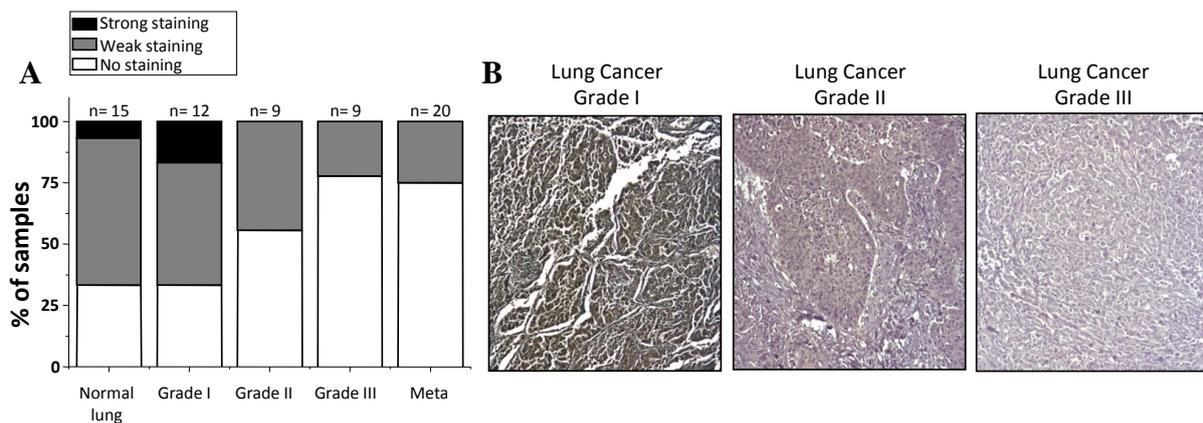
Une étude par western-blot révèle que le traitement de ces lignées cellulaires par le siRNA ciblant spécifiquement l'expression de  $\beta 4$  (si $\beta 4$ ) diminue la quantité de protéine 72 heures après transfection. L'invasivité cellulaire de chacune de ces lignées a été étudiée *in vitro* après transfection avec le si $\beta 4$  ou avec un siRNA ne ciblant aucun gène connu (siCTL) (figure 46).



**Figure 46 :** Effet de l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  par un siRNA sur l'invasivité de différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires et pulmonaires, exprimant ou non un canal  $\text{Na}_v$ . Les capacités d'invasivité des cellules ont été testées sur 24h. Représentation de la moyenne  $\pm$  sem. Statistiquement différent à \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  par rapport aux cellules traitées par un siCTL (test de Mann-Whitney). n correspond au nombre d'expériences répétées.

La diminution de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans ces différentes lignées cellulaires conduit, quelle que soit la lignée cellulaire testée, à une augmentation de leur invasivité de l'ordre de 40 %. Lorsqu'elle est exprimée, la sous-unité  $\beta 4$  semble donc être une protéine anti-invasive.

Une étude immunohistochimique réalisée sur des biopsies de tissus pulmonaires non cancéreux, cancéreux de différents grades (grade I à III) ou métastatiques (figure 47) montre des résultats similaires à ceux obtenus précédemment sur des biopsies de tissus cancéreux mammaires (figure 33) : on observe que seulement 25 % des biopsies de tissus cancéreux pulmonaires de grade III ou des biopsies de métastases expriment  $\beta 4$  (seulement une d'expression faible et jamais de forte expression) contre 70 % d'échantillons de tissus sain ou cancéreux de grade I qui expriment  $\beta 4$  à un niveau fort ou faible. Ces résultats devraient cependant être confirmés en augmentant le nombre de biopsies analysées.



**Figure 47 :** Expression de la protéine  $\beta 4$  dans des tissus cancéreux pulmonaires.

A, La protéine  $\beta 4$  est détectée par immunomarquage sur des biopsies de tissus pulmonaires non cancéreux (normal lung) ou cancéreux de grade I, II et III ainsi que sur des biopsies de métastases. L'expression de  $\beta 4$  a été classée suivant trois intensités de marquage : fort (strong staining, couleur noire), faible (weak staining, couleur grise) ou sans aucun marquage (no staining, couleur blanche). La proportion d'échantillons présentant des marquages forts, faibles ou absents est indiquée en fonction du grade histologique. B, Images représentatives de marquage de  $\beta 4$  en fonction du grade histologique.

Cette étude nous a donc permis de décrire un nouveau rôle de la sous-unité  $\beta 4$ , auxiliaire des canaux  $Na_v$ , dans l'invasivité des cellules cancéreuses. La généralisation de ces résultats à d'autres types de cellules cancéreuses (cellules cancéreuses prostatiques, du colon, de l'utérus, etc.) pourrait conforter son potentiel rôle comme gène suppresseur de tumeur. Il serait également intéressant d'étudier les mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  dans le but de mieux comprendre les mécanismes liés à l'agressivité tumorale et à la formation des métastases.

## Conclusion et perspectives

Le développement des métastases est responsable de la forte mortalité associée aux cancers, et il n'existe à ce jour aucun marqueur ni traitement spécifique ou préventif. Les métastases sont des foyers tumoraux secondaires formés dans d'autres tissus ou organes à la suite de l'échappement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire. Au cours du processus métastatique, les cellules cancéreuses acquièrent de nombreuses propriétés et en particulier les capacités de migration et d'invasion de la matrice extracellulaire. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces processus semblent donc déterminante afin de pouvoir prévenir la formation des métastases.

Les canaux sodiques sont connus pour être majoritairement exprimés dans les cellules excitables où ils participent à l'initiation et la propagation des potentiels d'action. Ils ont également été découverts dans des tissus non excitables et plus particulièrement dans différents types de cellules cancéreuses dans lesquelles ils sont associés à l'invasivité cellulaire et à un phénotype agressif (Roger et al., 2003; Roger et al., 2007; Smith et al., 1998). Le canal sodique dépendant du voltage  $\text{Na}_v1.5$  a été trouvé dans des biopsies de tissu cancéreux mammaire, et non dans les tissus sains, et son niveau d'expression est corrélé au développement métastatique (Fraser et al., 2005; Yang et al., 2012). Dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231, l'activité de l'isoforme néonatale de  $\text{Na}_v1.5$  favorise la dégradation de la matrice extracellulaire (invasion) par les cellules en augmentant l'activité protéolytique des protéases acides extracellulaires, les cathepsines B et S (Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). L'échangeur sodium-proton de type 1 (NHE-1) a été identifié comme la protéine régulatrice du pH responsable de cette acidification périmembranaire dans les cellules MDA-MB-231 (Brisson et al., 2011). Le canal  $\text{Na}_v1.5$  est colocalisé avec l'échangeur NHE-1, dans les radeaux lipidiques riches en cavéoline-1, et augmente son activité d'efflux de protons, favorable à l'activité des cathepsines extracellulaires (Brisson et al., 2011).

Les objectifs de cette thèse étaient dans un premier temps d'identifier les mécanismes moléculaires de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires et les mécanismes ou voies de signalisation impliqués dans la régulation de l'activité de NHE-1 par  $\text{Na}_v1.5$ . Dans un second temps, nous avons voulu déterminer, dans un modèle *in vivo*, le potentiel de l'inhibition pharmacologique de  $\text{Na}_v1.5$  dans la croissance tumorale et le développement des métastases. Enfin, nous avons étudié le rôle fonctionnel des sous-unités auxiliaires  $\beta$  des canaux sodiques dépendants du voltage *in vitro* et *in vivo* dans l'invasivité cellulaire.

Lors de ce travail, nous avons montré que les transporteurs ioniques  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 sont colocalisés dans des structures cellulaires spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, les invadopodes, au niveau desquels  $\text{Na}_v1.5$  augmente l'activité d'efflux de protons de NHE-1 par une modulation allostérique dont nous n'avons pas encore identifié le mécanisme. L'inhibition pharmacologique de ces deux protéines diminue donc la protéolyse extracellulaire mais participe

également à des changements morphologiques : les cellules perdent leur phénotype mésenchymateux. Il a récemment été montré que l'alcalinisation intracellulaire, favorisée par l'activité de NHE-1, permettait la polymérisation de l'actine et la formation des invadopodes (Magalhaes et al., 2011). La dynamique de polymérisation/dépolymérisation de l'actine est indispensable à la maturation des invadopodes. La cofiline et la cortactine sont les deux acteurs principaux de ce mécanisme : l'alcalinisation intracellulaire induite par l'activité de NHE-1 dissocie ces deux protéines, et chacune d'elle va favoriser la formation de nouveaux branchements et la polymérisation des filaments d'actine. Nous avons donc voulu étudier le rôle des canaux  $\text{Na}_v1.5$  sur la polymérisation de l'actine. L'inhibition pharmacologique de  $\text{Na}_v1.5$  par la TTX diminue la phosphorylation de la cortactine ainsi que l'activité des kinases Src. Ces résultats suggèrent que l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  augmente la polymérisation de l'actine en favorisant la phosphorylation de la cortactine via les kinases Src. Les deux transporteurs ioniques membranaires,  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1, participeraient donc conjointement à la formation et à l'activité protéolytique des invadopodes dans les cellules MDA-MB-231.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées concernant la régulation fonctionnelle de NHE-1 par  $\text{Na}_v1.5$ . Tout d'abord, leur proximité dans les invadopodes suggère que ces deux protéines participent à un complexe multiprotéique, éventuellement avec la cavéoline-1, qui favoriserait leur interaction fonctionnelle. Un changement de conformation du canal  $\text{Na}_v1.5$  lors de son activation pourrait directement influencer l'activité de NHE-1. Par ailleurs, la torsion membranaire induite par la formation des invadopodes pourrait créer un étirement de la membrane plasmique. Or, il a été démontré que  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 sont sensibles à l'étirement, ce qui favoriserait leur activation (Morris and Juranka, 2007). Les activités de  $\text{Na}_v1.5$  et de NHE-1 pourraient alors être augmentées dans les invadopodes par cette variation de tension mécanique.

La généralisation de cette étude à d'autres types cancéreux pourrait renforcer ce modèle. Nous disposons au laboratoire des lignées cellulaires H460, calu-1 (cellules cancéreuses pulmonaires) et PC3 (cellules cancéreuses de prostate) exprimant des canaux sodiques fonctionnels et dans lesquelles le rôle de la régulation du pH dans l'invasivité cellulaire n'a pas été étudié. De plus, des lignées cellulaires non cancéreuses (MCF-10A, MCF-12A, 184A1, etc.) ou faiblement invasives (MCF-7, MDA-MB-468, etc.) pourraient être transfectées avec  $\text{Na}_v1.5$  afin de regarder si son expression membranaire est suffisante pour induire la formation d'invadopodes et augmenter l'invasion de la matrice. Enfin, il est envisagé de développer un modèle cellulaire d'étude des interactions fonctionnelles entre  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 dans lequel ces deux protéines ne sont pas présentes et y seront surexprimées. Pour cela, nous disposons d'une lignée de fibroblastes de hamster (PS120) dépourvue de NHE-1 (lignée dérivée de CCL39) exprimant ou non NHE-1 humain (don du Pr Counillon, Université de Nice Sophia Antipolis) ainsi que des plasmides codant différentes isoformes

Na<sub>v</sub>1.5 muté ( $\Delta$ KPQ, gain de fonction ; R878C perte de fonction ; R104W dominant négatif) (don du Dr Guichenev, UPMC Paris). Nous pourrions également surexprimer d'autres isoformes de Na<sub>v</sub>. Ces différentes études permettraient alors de confirmer leurs interactions fonctionnelles mais également d'étudier l'importance de l'activité du canal dans cette interaction.

Le rôle du canal Na<sub>v</sub>1.5 dans l'invasivité cellulaire a également été mis en évidence par des études de colonisation pulmonaire chez la souris immunodéprimée. Nous avons vu que l'inhibition pharmacologique de Na<sub>v</sub>1.5 par la ranolazine diminuait l'invasivité cellulaire *in vitro* en diminuant l'activité protéolytique des cellules et en régulant le cytosquelette d'actine (étude de circularité). En relation avec notre première étude (rôle de Na<sub>v</sub>1.5 sur l'activité de NHE-1 dans les invadopodes), nous pouvons alors proposer que la ranolazine diminue la maturation et l'activité des invadopodes. Il serait alors intéressant de compléter cette étude en caractérisant son effet sur l'activité de NHE-1 ainsi que sur la polymérisation de l'actine. Par ailleurs, il a récemment été montré, dans un système d'expression (HEK-293), que la ranolazine inhibe la sensibilité à l'étirement des canaux Na<sub>v</sub>1.5 (Abriel, 2012). Si l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 est augmentée dans les invadopodes de part sa sensibilité à l'étirement, la ranolazine pourrait alors l'inhiber (de façon plus importante dans les invadopodes qui sont des sites de tension par torsion) et ainsi diminuer préférentiellement l'activité de NHE-1 et la polymérisation de l'actine dans ces zones spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

L'inhibition pharmacologique de Na<sub>v</sub>1.5 par un traitement avec la ranolazine diminue également la colonisation pulmonaire par les cellules MDA-MB-231 chez des souris immunodéprimées. Cette étude ainsi que celle menée par l'équipe de M.L. Brown sur un modèle d'injection sous-cutanée de cellules cancéreuses prostatiques humaines exprimant les canaux Na<sub>v</sub> (Grimes et al., 1995) démontrent le fort potentiel de l'inhibition pharmacologique de Na<sub>v</sub> et des voies de signalisation associées dans la croissance tumorale et le développement de métastases. Un modèle de xénogreffe orthotopique, en cours de développement, permettrait de caractériser plus précisément le rôle de Na<sub>v</sub>1.5 dans le développement de la tumeur primaire dans le tissu d'origine, la glande mammaire et dans la capacité des cellules à former des métastases. Afin de cibler préférentiellement les canaux Na<sub>v</sub> des cellules cancéreuses, il serait intéressant de développer des inhibiteurs spécifiques de l'isoforme néonatale de Na<sub>v</sub>1.5, qui est exprimé dans les cellules cancéreuses suite à un épissage alternatif.

Nous avons en parallèle étudié le rôle des sous-unités auxiliaires  $\beta$  des canaux Na<sub>v</sub>. Les cellules MDA-MB-231 exprimant les sous-unités  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 4, nous pouvions émettre l'hypothèse, au début de l'étude, que la régulation de l'invasivité protéolytique de la matrice extracellulaire dépendante de Na<sub>v</sub>1.5 et NHE-1 dans ces cellules pouvait être modulée par les sous-unités  $\beta$ . Cependant, deux effets distincts ont été observés en fonction des sous-unités. L'inhibition de l'expression des sous-unités  $\beta$ 1

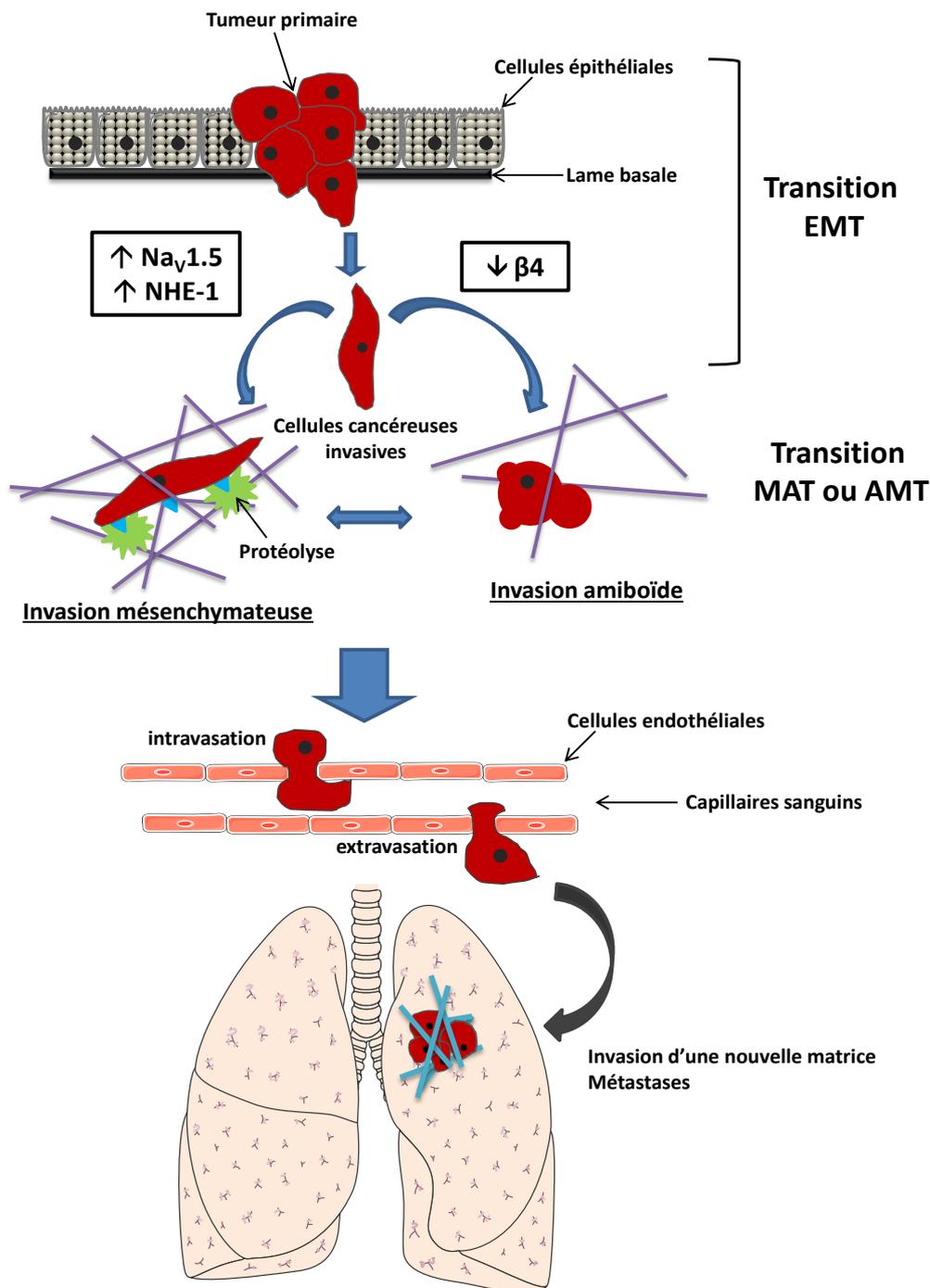
et  $\beta 2$  diminue l'invasivité cellulaire, ce qui indiquent qu'elles participent naturellement à l'augmentation de la capacité invasive des cellules MDA-MB-231 alors qu'à l'inverse, l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  a un effet pro-invasif. Chacune de ces sous-unités a donc un rôle spécifique. L'étude de l'expression en ARNm des quatre gènes codant pour les sous-unités  $\beta$ , sur des cohortes de patientes atteinte d'un cancer du sein, confirme l'importance de la diminution d'expression de la sous-unité  $\beta 4$  au cours de la progression tumorale et nous a conduits à nous intéresser plus spécifiquement à cette sous-unité.

Il sera intéressant d'étudier le rôle des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Plusieurs hypothèses pourront être explorées pour comprendre leur rôle pro-invasif. Elles pourraient favoriser l'expression ou l'adressage membranaire des canaux  $\text{Na}_v1.5$ . Il a été montré dans d'autres modèles (cellules excitables) que les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  pourraient favoriser l'expression ou l'adressage membranaire des canaux  $\text{Na}_v1.5$  (Fahmi et al., 2001) ou de l'isoforme  $\text{Na}_v1.2$  (Makita et al., 1996; McCormick et al., 1998; Meadows et al., 2001). La diminution de l'invasivité des cellules MDA-MB-231 lorsque l'expression des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  est inhibée pourrait être expliquée par une diminution de l'adressage membranaire des canaux  $\text{Na}_v1.5$  et donc une diminution du courant sodique global dans les cellules. Cette diminution influencerait directement l'échangeur NHE-1 et inhiberait la dégradation de la matrice extracellulaire par les cathepsines. Une étude récente sur l'implication de la sous-unité  $\beta 1$  dans la formation des métastases *in vivo*, propose que cette sous-unité intervienne comme molécule d'adhésion cellulaire (Nelson M et al. 2014). Elle favoriserait l'adhésion *trans*-homophile et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux agressif avec la formation de prolongements membranaires dépendante de l'activation de la voie des kinases Src (Nelson et al., 2014). Les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  pourraient donc faire partie du macrocomplexe protéique comprenant  $\text{Na}_v1.5$  / NHE-1. Elles pourraient peut-être participer à l'interaction fonctionnelle entre  $\text{Na}_v1.5$  et NHE-1 ainsi qu'entre  $\text{Na}_v1.5$  et les kinases Src et ainsi favoriser la maturation et l'activité protéolytique des invadopodes.

Tous les résultats obtenus au cours de cette étude semblent indiquer un rôle du gène *SCN4B* comme suppresseur de tumeur. En effet, la faible expression en ARNm de  $\beta 4$  est corrélée à une faible survie des patientes atteintes d'un cancer du sein et il a été montré une corrélation entre la diminution d'expression de  $\beta 4$  et le grade élevé du cancer sur des biopsies de tissus cancéreux mammaires et pulmonaires. Les expériences *in vitro* et *in vivo* montrent que l'inhibition de l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  augmente l'invasivité cellulaire. Lors de la cancérogénèse, il a été proposé que les altérations du gène p53 puissent diminuer l'expression du gène *SCN3B* dans les cellules cancéreuses de colon (Adachi et al., 2004). L'expression du gène *SCN4B* pourrait également être sous la dépendance de ce facteur de transcription.

Le mécanisme de régulation de l'invasivité cellulaire par  $\beta 4$  semble complexe et semble indépendant de la voie  $\text{Na}_v1.5$  / NHE-1 précédemment décrite. Nous avons mis en évidence un rôle clé du

domaine intracellulaire (comprenant le segment transmembranaire) de la protéine  $\beta 4$  dans l'inhibition de l'invasivité cellulaire. La diminution de son expression pourrait lever l'inhibition de certains facteurs pro-invasifs ou favoriser certaines voies de signalisation impliquées dans l'invasivité cellulaire. Nous avons remarqué que les cellules, lorsque l'expression de la sous-unité  $\beta 4$  est inhibée, ont un phénotype différent : elles sont plus rondes à l'étude microscopique et sont plus invasives. Par ailleurs, l'augmentation d'invasivité ne semble pas associée à une augmentation de l'activité protéolytique. Ces propriétés sont des caractéristiques de l'invasion (migration) amiboïde (Friedl et al., 2004; Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2005). Cette invasivité s'effectue à une vitesse pouvant être jusqu'à 20 fois supérieure à l'invasivité mésenchymateuse puisqu'elle ne nécessite pas de recyclage des protéines impliquées dans l'établissement des points focaux d'adhésion (Friedl and Wolf, 2003). Nous pouvons alors formuler l'hypothèse que l'augmentation de l'invasivité cellulaire lorsque  $\beta 4$  n'est plus exprimée est due à l'acquisition d'un phénotype amiboïde. Lorsque l'expression de  $\beta 4$  est inhibée, l'activation de la voie Rho serait privilégiée, conduisant les cellules vers un phénotype amiboïde. Ces deux types d'invasivité sont utilisés par les cellules cancéreuses dans le processus de formation des métastases. L'augmentation de l'activité de  $\text{Na}_v1.5$  et de NHE-1 conférerait aux cellules un avantage dans le passage de tissus complexes et denses, nécessitant une protéolyse, alors que la diminution d'expression de  $\beta 4$  permettrait aux cellules d'acquérir un phénotype amiboïde, important dans l'invasivité mais également dans les capacités d'intravasation et d'extravasation pour permettre aux cellules d'entrer/sortir de la circulation et coloniser de nouveaux tissus. Les acteurs de ces différents modes d'invasion,  $\text{Na}_v1.5$  / NHE-1 pour l'invasivité mésenchymateuse et  $\beta 4$  pour l'invasivité amiboïde, ont donc chacun un rôle important et complémentaire dans le processus de formation des métastases (figure 48).



**Figure 48:** Schéma hypothétique de la participation des protéines  $\text{Na}_v1.5$  / NHE-1 et  $\beta4$  dans la formation des métastases.

Durant la cancérogénèse, les cellules épithéliales cancéreuses se différencient et acquièrent un phénotype différent de celui des cellules épithéliales d'origine, ce nouveau phénotype leur conférant des propriétés de prolifération, de migration et d'invasivité, c'est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Les cellules doivent avoir un phénotype mésochymateux pour pouvoir dégrader et traverser la lame basale. La migration et l'invasivité des cellules cancéreuses dans le tissu sous-jacent dépendront de leur environnement extracellulaire et de leur phénotype. Les cellules ayant la capacité de passer d'un phénotype mésochymateux à amiboïde (MAT) ou inversement (AMT) auront un avantage sélectif. Dans les cellules invasives, les activités de  $\text{Na}_v1.5$  et de NHE-1 seraient favorables à une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (invasion mésochymateuse). La diminution d'expression de  $\beta4$  permettrait aux cellules d'acquérir un phénotype amiboïde. Le phénotype amiboïde est important dans les capacités d'intravasation et d'extravasation et permet aux cellules d'entrer dans la circulation pour ensuite coloniser d'autres tissus.

## Références bibliographiques

---

- Abriel, H. (2012). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 mechanosensitivity is inhibited by ranolazine. *Circulation* 125, 2681-2683.
- Abriel, H., Kamynina, E., Horisberger, J.D., and Staub, O. (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na<sup>+</sup> channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS letters* 466, 377-380.
- Adachi, K., Toyota, M., Sasaki, Y., Yamashita, T., Ishida, S., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Hinoda, Y., Saito, T., Imai, K., et al. (2004). Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. *Oncogene* 23, 7791-7798.
- Adam, K.R., and Weiss, C. (1959). Actions of scorpion venom on skeletal muscle. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 14, 334-339.
- Ahern, C.A., Zhang, J.F., Wookalis, M.J., and Horn, R. (2005). Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circulation research* 96, 991-998.
- Ahern, G.P., Hsu, S.F., Klyachko, V.A., and Jackson, M.B. (2000). Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 275, 28810-28815.
- Aiba, T., Hesketh, G.G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M.C., O'Rourke, B., Akar, F.G., and Tomaselli, G.F. (2010). Na<sup>+</sup> channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 85, 454-463.
- Akopian, A.N., Sivilotti, L., and Wood, J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257-262.
- Akopian, A.N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., Smith, A., Kerr, B.J., McMahon, S.B., Boyce, S., et al. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature neuroscience* 2, 541-548.
- Albrechtsen, R., Stautz, D., Sanjay, A., Kveiborg, M., and Wewer, U.M. Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. *Experimental cell research* 317, 195-209.
- Allard, B., Magloire, H., Couble, M.L., Maurin, J.C., and Bleicher, F. (2006). Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *The Journal of biological chemistry* 281, 29002-29010.
- Allen, D.H., Lepple-Wienhues, A., and Cahalan, M.D. (1997). Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *The Journal of membrane biology* 155, 27-34.
- Allouis, M., Le Bouffant, F., Wilders, R., Peroz, D., Schott, J.J., Noireaud, J., Le Marec, H., Merot, J., Escande, D., and Baro, I. (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circulation research* 98, 1538-1546.
- Aman, T.K., Grieco-Calub, T.M., Chen, C., Rusconi, R., Slat, E.A., Isom, L.L., and Raman, I.M. (2009). Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* 29, 2027-2042.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry* 271, 20246-20249.
- Anderson, P.A., and Greenberg, R.M. (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 17-28.
- Andrikopoulos, P., Fraser, S.P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J.K., Box, C., Eccles, S.A., and Djamgoz, M.B. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na<sup>+</sup> Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *The Journal of biological chemistry* 286, 16846-16860.

- Anger, T., Madge, D.J., Mulla, M., and Riddall, D. (2001). Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *Journal of medicinal chemistry* 44, 115-137.
- Antzelevitch, C., Belardinelli, L., Zygmunt, A.C., Burashnikov, A., Di Diego, J.M., Fish, J.M., Cordeiro, J.M., and Thomas, G. (2004). Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation* 110, 904-910.
- Armstrong, C.M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiological reviews* 61, 644-683.
- Arnolds, D.E., Liu, F., Fahrenbach, J.P., Kim, G.H., Schillinger, K.J., Smemo, S., McNally, E.M., Nobrega, M.A., Patel, V.V., and Moskowitz, I.P. (2012). TBX5 drives Scn5a expression to regulate cardiac conduction system function. *The Journal of clinical investigation* 122, 2509-2518.
- Aronica, E., Troost, D., Rozemuller, A.J., Yankaya, B., Jansen, G.H., Isom, L.L., and Gorter, J.A. (2003). Expression and regulation of voltage-gated sodium channel beta1 subunit protein in human gliosis-associated pathologies. *Acta neuropathologica* 105, 515-523.
- Artym, V.V., Matsumoto, K., Mueller, S.C., and Yamada, K.M. (2011). Dynamic membrane remodeling at invadopodia differentiates invadopodia from podosomes. *European journal of cell biology* 90, 172-180.
- Ashpole, N.M., Herren, A.W., Ginsburg, K.S., Brogan, J.D., Johnson, D.E., Cummins, T.R., Bers, D.M., and Hudmon, A. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* 287, 19856-19869.
- Audenaert, D., Claes, L., Ceulemans, B., Lofgren, A., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2003). A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology* 61, 854-856.
- Bakhramov, A., Boriskin, Y.S., Booth, J.C., and Bolton, T.B. (1995). Activation and deactivation of membrane currents in human fibroblasts following infection with human cytomegalovirus. *Biochimica et biophysica acta* 1265, 143-151.
- Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M.A., Luini, A., and Buccione, R. (2003). Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Molecular biology of the cell* 14, 1074-1084.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Banks-Schlegel, S.P., Gazdar, A.F., and Harris, C.C. (1985). Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer research* 45, 1187-1197.
- Bant, J.S., and Raman, I.M. (2010). Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel beta4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12357-12362.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends in cell biology* 13, 295-300.
- Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A., and Chahine, M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circulation research* 88, E78-83.
- Becchetti, A. (2011). Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C255-265.
- Beltran-Alvarez P., Tarradas A., Chiva C., Pérez-Serra A., Batlle M., Pérez-Villa F., Schulte U., Sabidó E., Brugada R., Pagans S. (2014). Identification of N-terminal protein acetylation and arginine methylation of the voltage-gated sodium channel in end-stage heart failure human heart. *J Mol Cell Cardiol* 27, 76C, 126-129.
- Beltran-Alvarez P., Espejo A, Schmauder R, Beltran C, Mrowka R, Linke T, Batlle M, Pérez-Villa F, Pérez GJ, Scornik FS, Benndorf K, Pagans S, Zimmer T, Brugada R. (2013). Protein arginine methyl transferases-3 and -5 increase cell surface expression of cardiac sodium channel. *FEBS Lett* 19, 3159-65.

- Beltran-Alvarez P, Pagans S, Brugada R. (2011). The cardiac sodium channel is post-translationally modified by arginine methylation. *J Proteome Res* 8, 3712-9
- Beneski, D.A., and Catterall, W.A. (1980). Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 639-643.
- Bennett, E.S., Smith, B.A., and Harper, J.M. (2004). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* 447, 908-914.
- Bennett, V. (1992). Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 267, 8703-8706.
- Black, J.A., Liu, S., and Waxman, S.G. (2009). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* 57, 1072-1081.
- Black, J.A., and Waxman, S.G. (2012). Sodium channels and microglial function. *Experimental neurology* 234, 302-315.
- Black, J.A., Westenbroek, R.E., Catterall, W.A., and Waxman, S.G. (1995). Type II brain sodium channel expression in non-neuronal cells: embryonic rat osteoblasts. *Brain research* 34, 89-98.
- Boron, W.F., and De Weer, P. (1976). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67, 91-112.
- Boyle, L.H., Gillingham, A.K., Munro, S., and Trowsdale, J. (2006). Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail. *J Immunol* 176, 6464-6472.
- Brackenbury, W.J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin, Tex)* 6, 352-361.
- Brackenbury, W.J., Davis, T.H., Chen, C., Slat, E.A., Detrow, M.J., Dickendesher, T.L., Ranscht, B., and Isom, L.L. (2008). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* 28, 3246-3256.
- Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2011). Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Frontiers in pharmacology* 2, 53.
- Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J.Y., Roger, S., and Gore, J. (2011). Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE-1-dependent H<sup>(+)</sup> efflux in caveolae. *Oncogene* 30, 2070-2076.
- Bronte, G., Rizzo, S., La Paglia, L., Adamo, V., Siragusa, S., Ficorella, C., Santini, D., Bazan, V., Colucci, G., Gebbia, N., *et al.* (2010). Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Cancer treatment reviews* 36 Suppl 3, S21-29.
- Busco, G., Cardone, R.A., Greco, M.R., Bellizzi, A., Colella, M., Antelmi, E., Mancini, M.T., Dell'Aquila, M.E., Casavola, V., Paradiso, A., *et al.* (2010). NHE-1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *Faseb J* 24, 3903-3915.
- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* 14, 911-915.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* 53, 661-674.
- Caldieri, G., Giacchetti, G., Beznoussenko, G., Attanasio, F., Ayala, I., and Buccione, R. (2009). Invadopodia biogenesis is regulated by caveolin-mediated modulation of membrane cholesterol levels. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 1728-1740.
- Campbell, T.M., Main, M.J., and Fitzgerald, E.M. (2013). Functional expression of the voltage-gated Na<sup>(+)</sup>-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of cell science* 126, 4939-4949.
- Carrithers, M.D., Chatterjee, G., Carrithers, L.M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., and Waxman, S.G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *The Journal of biological chemistry* 284, 8114-8126.

- Carrithers, M.D., Dib-Hajj, S., Carrithers, L.M., Tokmoulina, G., Pypaert, M., Jonas, E.A., and Waxman, S.G. (2007). Expression of the voltage-gated sodium channel NaV1.5 in the macrophage late endosome regulates endosomal acidification. *J Immunol* 178, 7822-7832.
- Casini, S., Verkerk, A.O., van Borren, M.M., van Ginneken, A.C., Veldkamp, M.W., de Bakker, J.M., and Tan, H.L. (2009). Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovascular research* 81, 72-81.
- Casula, M.A., Facer, P., Powell, A.J., Kinghorn, I.J., Plumpton, C., Tate, S.N., Bountra, C., Birch, R., and Anand, P. (2004). Expression of the sodium channel beta3 subunit in injured human sensory neurons. *Neuroreport* 15, 1629-1632.
- Catterall, W.A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiological reviews* 72, S15-48.
- Catterall, W.A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental physiology* 99, 35-51.
- Catterall, W.A., and Yarov-Yarovoy, V. (2010). Helical motion of an S4 voltage sensor revealed by gating pore currents. *Channels (Austin, Tex)* 4, 75-77.
- Cestele, S., and Catterall, W.A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 730-736.
- Chauhan, V.S., Tuvia, S., Buhusi, M., Bennett, V., and Grant, A.O. (2000). Abnormal cardiac Na(+) channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circulation research* 86, 441-447.
- Chen, C., Bharucha, V., Chen, Y., Westenbroek, R.E., Brown, A., Malhotra, J.D., Jones, D., Avery, C., Gillespie, P.J., 3rd, Kazen-Gillespie, K.A., et al. (2002). Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 17072-17077.
- Chen, C., Calhoun, J.D., Zhang, Y., Lopez-Santiago, L., Zhou, N., Davis, T.H., Salzer, J.L., and Isom, L.L. (2012). Identification of the cysteine residue responsible for disulfide linkage of Na<sup>+</sup> channel alpha and beta2 subunits. *The Journal of biological chemistry* 287, 39061-39069.
- Chen, R., and Chung, S.H. (2014). Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels. *Biochemical and biophysical research communications* 446, 370-374.
- Chen, Y., Yu, F.H., Surmeier, D.J., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Neuromodulation of Na<sup>+</sup> channel slow inactivation via cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Neuron* 49, 409-420.
- Cheng, J., Van Norstrand, D.W., Medeiros-Domingo, A., Valdivia, C., Tan, B.H., Ye, B., Kroboth, S., Vatta, M., Tester, D.J., January, C.T., et al. (2009). Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 667-676.
- Chioni, A.M., Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Isom, L.L., and Djamgoz, M.B. (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1216-1227.
- Clarkson, Y.L., Perkins, E.M., Cairncross, C.J., Lyndon, A.R., Skehel, P.A., and Jackson, M. (2014). beta-III spectrin underpins ankyrin R function in Purkinje cell dendritic trees: protein complex critical for sodium channel activity is impaired by SCA5-associated mutations. *Human molecular genetics* 23, 3875-3882.
- Conti, M. (2007). Targeting ion channels for new strategies in cancer diagnosis and therapy. *Current clinical pharmacology* 2, 135-144.
- Craner, M.J., Damarjian, T.G., Liu, S., Hains, B.C., Lo, A.C., Black, J.A., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Waxman, S.G. (2005). Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia* 49, 220-229.

- Cuddapah, V.A., and Sontheimer, H. (2011). Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C541-549.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science (New York, NY)* 294, 1708-1712.
- Cummins, T.R., Aglieco, F., Renganathan, M., Herzog, R.I., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2001). Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. *J Neurosci* 21, 5952-5961.
- Davis, G.C., Kong, Y., Paige, M., Li, Z., Merrick, E.C., Hansen, T., Suy, S., Wang, K., Dakshanamurthy, S., Cordova, A., et al. (2012). Asymmetric synthesis and evaluation of a hydroxyphenylamide voltage-gated sodium channel blocker in human prostate cancer xenografts. *Bioorganic & medicinal chemistry* 20, 2180-2188.
- Deschenes, I., Neyroud, N., DiSilvestre, D., Marban, E., Yue, D.T., and Tomaselli, G.F. (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circulation research* 90, E49-57.
- de Visser, K.E., and Coussens, L.M. (2006). The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contributions to microbiology* 13, 118-137.
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Korichneva, I., and Ouadid-Ahidouch, H. (2014). TRPM7 involvement in cancer: a potential prognostic factor. *Magnes Res* 27, 103-112.
- Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernandez-Gallegos, E., Ramirez-Dominguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S., Berumen, J., Camacho, J., and Gomora, J.C. (2007). Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *Journal of cellular physiology* 210, 469-478.
- Dib-Hajj, S., Black, J.A., Cummins, T.R., and Waxman, S.G. (2002). NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends in neurosciences* 25, 253-259.
- Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., and Djamgoz, M.B. (2001). Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *The Prostate* 48, 165-178.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., and Djamgoz, M.B. (2008). Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate cancer and prostatic diseases* 11, 325-333.
- Djamgoz, M.B.A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S.P., and Korohoda, W. (2001). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na+ channel activity. *Journal of cell science* 114, 2697-2705.
- Doi, J., Takemori, H., Lin, X.Z., Horike, N., Katoh, Y., and Okamoto, M. (2002). Salt-inducible kinase represses cAMP-dependent protein kinase-mediated activation of human cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 promoter through the CREB basic leucine zipper domain. *The Journal of biological chemistry* 277, 15629-15637.
- Edsparr, K., Basse, P.H., Goldfarb, R.H., and Albertsson, P. (2011). Matrix metalloproteinases in cytotoxic lymphocytes impact on tumour infiltration and immunomodulation. *Cancer Microenviron* 4, 351-360.
- Fahmi, A.I., Patel, M., Stevens, E.B., Fowden, A.L., John, J.E., 3rd, Lee, K., Pinnock, R., Morgan, K., Jackson, A.P., and Vandenberg, J.I. (2001). The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *The Journal of physiology* 537, 693-700.
- Fotia, A.B., Ekberg, J., Adams, D.J., Cook, D.I., Poronnik, P., and Kumar, S. (2004). Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* 279, 28930-28935.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., et al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 5381-5389.

- Fraser, S.P., Diss, J.K., Lloyd, L.J., Pani, F., Chioni, A.M., George, A.J., and Djamgoz, M.B. (2004). T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na<sup>+</sup> channel activity. *FEBS letters* 569, 191-194.
- Fredj, S., Sampson, K.J., Liu, H., and Kass, R.S. (2006). Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *British journal of pharmacology* 148, 16-24.
- Friedl, P., and Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147, 992-1009.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International journal of developmental biology* 48, 441-449.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews* 3, 362-374.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology* 188, 11-19.
- Frohnwieser, B., Chen, L.Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R.G. (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *The Journal of physiology* 498 ( Pt 2), 309-318.
- Fuhrman, F.A. (1967). Tetrodotoxin. It is a powerful poison that is found in two almost totally unrelated kinds of animal: puffer fish and newts. It has been serving as a tool in nerve physiology and may provide a model for new local anesthetics. *Scientific American* 217, 60-71.
- Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M.V., Miceli, F., Amoroso, S., Annunziato, L., Procopio, A., and Tagliatalata, M. (2006). Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1146-1159.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., and Wang, Z. (2010). Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncology reports* 23, 1293-1299.
- Gaspar, R., Jr., Weidema, A.F., Krasznai, Z., Nijweide, P.J., and Ypey, D.L. (1995). Tetrodotoxin-sensitive fast Na<sup>+</sup> current in embryonic chicken osteoclasts. *Pflugers Arch* 430, 596-598.
- Gersbacher, M.T., Kim, D.Y., Bhattacharyya, R., and Kovacs, D.M. (2010). Identification of BACE1 cleavage sites in human voltage-gated sodium channel beta 2 subunit. *Molecular neurodegeneration* 5, 61.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417-1423.
- Gilchrist, J., Das, S., Van Petegem, F., and Bosmans, F. (2013). Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the beta4 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E5016-5024.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., and Le Guennec, J.Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 8680-8691.
- Gold, M.S., Weinreich, D., Kim, C.S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F., and Lai, J. (2003). Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 158-166.
- Goldin, A.L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology* 63, 871-894.
- Goldin, A.L. (2002). Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *The Journal of experimental biology* 205, 575-584.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.

- Goldin, A.L., Snutch, T., Lubbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L.C., Lester, H.A., Dunn, R., et al. (1986). Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7503-7507.
- Golub, T., and Pico, C. (2005). Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-rich raft assemblies. *Biochemical Society symposium*, 119-127.
- Grieco, T.M., Malhotra, J.D., Chen, C., Isom, L.L., and Raman, I.M. (2005). Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. *Neuron* 45, 233-244.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., and Djamgoz, M.B. (1995). Differential expression of voltage-activated Na<sup>+</sup> currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS letters* 369, 290-294.
- Grob, M., Drolet, G., and Mougnot, D. (2004). Specific Na<sup>+</sup> sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 24, 3974-3984.
- Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C493-502.
- Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 508-512.
- Haenggi, T., and Fritschy, J.M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci* 63, 1614-1631.
- Hakim, P., Brice, N., Thresher, R., Lawrence, J., Zhang, Y., Jackson, A.P., Grace, A.A., and Huang, C.L. (2010). *Scn3b* knockout mice exhibit abnormal sino-atrial and cardiac conduction properties. *Acta physiologica (Oxford, England)* 198, 47-59.
- Hakim, P., Gurung, I.S., Pedersen, T.H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A.A., and Huang, C.L. (2008). *Scn3b* knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Progress in biophysics and molecular biology* 98, 251-266.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
- Hammarstrom, A.K., and Gage, P.W. (2002). Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J* 31, 323-330.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harvey, K.F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C.N., Day, M.L., Parasivam, G., Cook, D.I., and Kumar, S. (1999). All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na<sup>+</sup>. *The Journal of biological chemistry* 274, 12525-12530.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., and Imoto, K. (1992). Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels. *Pflugers Arch* 422, 90-92.
- Helms, J.B., and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, 247-254.
- Herfst L.J., Rook M.B., Jongsma H.J. (2003). Trafficking and functional expression of cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Mol Cell Cardiol* 2, 185-93.
- Hernandez-Plata, E., Ortiz, C.S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M., and Gomora, J.C. (2012). Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International journal of cancer* 130, 2013-2023.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., and Shibuya, M. (2002). MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer cell* 2, 289-300.

- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117, 500-544.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 13, 215.
- Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varro, A., Pfeiffer, R., Koopmann, T.T., Cordeiro, J.M., Guerchicoff, A., *et al.* (2009). A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 270-278.
- Huang, J.B., Kindzelskii, A.L., Clark, A.J., and Petty, H.R. (2004). Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer research* 64, 2482-2489.
- Huber, M.A., Kraut, N., and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 17, 548-558.
- Huth, T., Rittger, A., Saftig, P., and Alzheimer, C. (2011). beta-Site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) cleaves cerebellar Na<sup>+</sup> channel beta4-subunit and promotes Purkinje cell firing by slowing the decay of resurgent Na<sup>+</sup> current. *Pflugers Arch* 461, 355-371.
- Hwang, D.F., Tai, K.P., Chueh, C.H., Lin, L.C., and Jeng, S.S. (1991). Tetrodotoxin and derivatives in several species of the gastropod Naticidae. *Toxicon* 29, 1019-1024.
- Ishikawa, T., Takahashi, N., Ohno, S., Sakurada, H., Nakamura, K., On, Y.K., Park, J.E., Makiyama, T., Horie, M., Arimura, T., *et al.* (2013). Novel SCN3B mutation associated with brugada syndrome affects intracellular trafficking and function of Nav1.5. *Circ J* 77, 959-967.
- Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science (New York, NY)* 256, 839-842.
- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433-442.
- Jang, S.H., Kang, K.S., Ryu, P.D., and Lee, S.Y. (2009). Kv1.3 voltage-gated K(+) channel subunit as a potential diagnostic marker and therapeutic target for breast cancer. *BMB reports* 42, 535-539.
- Jansson, K.H., Castillo, D.G., Morris, J.W., Boggs, M.E., Czymbek, K.J., Adams, E.L., Schramm, L.P., and Sikes, R.A. (2014). Identification of beta-2 as a key cell adhesion molecule in PCa cell neurotropic behavior: a novel *ex vivo* and biophysical approach. *PloS one* 9, e98408.
- Jansson, K.H., Lynch, J.E., Lepori-Bui, N., Czymbek, K.J., Duncan, R.L., and Sikes, R.A. (2012). Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior. *The Prostate* 72, 1080-1092.
- Jedezsko, C., and Sloane, B.F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biological chemistry* 385, 1017-1027.
- Jespersen, T., Gavillet, B., van Bemmelen, M.X., Cordonier, S., Thomas, M.A., Staub, O., and Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 1455-1462.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2003a). X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423, 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003b). The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423, 42-48.
- Johnson, M.D., Torri, J.A., Lippman, M.E., and Dickson, R.B. (1993). The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer research* 53, 873-877.
- Joyce, J.A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraud, E., Tsai, F.Y., Greenbaum, D.C., Hager, J.H., Bogoy, M., and Hanahan, D. (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer cell* 5, 443-453.

- Kapoor, N., Bartoszewski, R., Qadri, Y.J., Bebok, Z., Bubien, J.K., Fuller, C.M., and Benos, D.J. (2009). Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. *The Journal of biological chemistry* 284, 24526-24541.
- Kazarinova-Noyes, K., Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Mattei, L.N., Berglund, E.O., Ranscht, B., Levinson, S.R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L.L., *et al.* (2001). Contactin associates with Na<sup>+</sup> channels and increases their functional expression. *J Neurosci* 21, 7517-7525.
- Kazen-Gillespie, K.A., Ragsdale, D.S., D'Andrea, M.R., Mattei, L.N., Rogers, K.E., and Isom, L.L. (2000). Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *The Journal of biological chemistry* 275, 1079-1088.
- Kellenberger, S., West, J.W., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1997). Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* 109, 589-605.
- Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M., Woolf, C.J., *et al.* (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nature cell biology* 9, 755-764.
- Kim, D.Y., Ingano, L.A., Carey, B.W., Pettingell, W.H., and Kovacs, D.M. (2005). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *The Journal of biological chemistry* 280, 23251-23261.
- Kim, D.Y., Wertz, M.H., Gautam, V., D'Avanzo, C., Bhattacharyya, R., and Kovacs, D.M. (2014). The E280A presenilin mutation reduces voltage-gated sodium channel levels in neuronal cells. *Neuro-degenerative diseases* 13, 64-68.
- Kis-Toth, K., Hajdu, P., Bacskai, I., Szilagyi, O., Papp, F., Szanto, A., Posta, E., Gogolak, P., Panyi, G., and Rajnavolgyi, E. (2011). Voltage-gated sodium channel Nav1.7 maintains the membrane potential and regulates the activation and chemokine-induced migration of a monocyte-derived dendritic cell subset. *J Immunol* 187, 1273-1280.
- Ko, J.H., Park, W.S., Kim, S.J., and Earm, Y.E. (2006). Slowing of the inactivation of voltage-dependent sodium channels by staurosporine, the protein kinase C inhibitor, in rabbit atrial myocytes. *European journal of pharmacology* 534, 48-54.
- Kontis, K.J., Rounaghi, A., and Goldin, A.L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *The Journal of general physiology* 110, 391-401.
- Korotzer, A.R., and Cotman, C.W. (1992). Voltage-gated currents expressed by rat microglia in culture. *Glia* 6, 81-88.
- Krzemien, D.M., Schaller, K.L., Levinson, S.R., and Caldwell, J.H. (2000). Immunolocalization of sodium channel isoform NaCh6 in the nervous system. *The Journal of comparative neurology* 420, 70-83.
- Kurakami, K., and Ishii, K. (2013). Is a novel SCN3B mutation commonly found in SCN5A-negative Brugada syndrome patients? *Circ J* 77, 900-901.
- Lacroix, J., Poet, M., Maehrel, C., and Counillon, L. (2004). A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. *EMBO reports* 5, 91-96.
- Lane, D.P., and Benchimol, S. (1990). p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes & development* 4, 1-8.
- Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover *in vivo*. *Nature* 388, 78-82.
- Lastraioli, E., Guasti, L., Crociani, O., Polvani, S., Hofmann, G., Witchel, H., Bencini, L., Calistri, M., Messerini, L., Scatizzi, M., *et al.* (2004). hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer research* 64, 606-611.
- Lee, M.S., Kim, S., Kim, B.G., Won, C., Nam, S.H., Kang, S., Kim, H.J., Kang, M., Ryu, J., Song, H.E., *et al.* (2014). Snail1 induced in breast cancer cells in 3D collagen I gel environment suppresses contactin and impairs effective invadopodia formation. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 2037-2054.

- Lemaillet, G., Walker, B., and Lambert, S. (2003). Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *The Journal of biological chemistry* 278, 27333-27339.
- Lewis, A.H., and Raman, I.M. (2011). Cross-species conservation of open-channel block by Na channel beta4 peptides reveals structural features required for resurgent Na current. *J Neurosci* 31, 11527-11536.
- Lewis, A.H., and Raman, I.M. (2013). Interactions among DIV voltage-sensor movement, fast inactivation, and resurgent Na current induced by the Navbeta4 open-channel blocking peptide. *The Journal of general physiology* 142, 191-206.
- Li, R.G., Wang, Q., Xu, Y.J., Zhang, M., Qu, X.K., Liu, X., Fang, W.Y., and Yang, Y.Q. (2013). Mutations of the SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in familial atrial fibrillation. *International journal of molecular medicine* 32, 144-150.
- Linder, S. (2009). Invadosomes at a glance. *Journal of cell science* 122, 3009-3013.
- Liu, H., Sun, H.Y., Lau, C.P., and Li, G.R. (2007). Regulation of voltage-gated cardiac sodium current by epidermal growth factor receptor kinase in guinea pig ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42, 760-768.
- Liu, M., Sanyal, S., Gao, G., Gurung, I.S., Zhu, X., Gaconnet, G., Kerchner, L.J., Shang, L.L., Huang, C.L., Grace, A., *et al.* (2009). Cardiac Na<sup>+</sup> current regulation by pyridine nucleotides. *Circulation research* 105, 737-745.
- Lo, W.L., Donermeyer, D.L., and Allen, P.M. (2012). A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nature immunology* 13, 880-887.
- Long, B.J., and Rose, D.P. (1996). Invasive capacity and regulation of urokinase-type plasminogen activator in estrogen receptor (ER)-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells, and a transfectant (S30) stably expressing ER. *Cancer letters* 99, 209-215.
- Lopez-Santiago, L.F., Pertin, M., Morisod, X., Chen, C., Hong, S., Wiley, J., Decosterd, I., and Isom, L.L. (2006). Sodium channel beta2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain. *J Neurosci* 26, 7984-7994.
- Lowe, J.S., Palygin, O., Bhasin, N., Hund, T.J., Boyden, P.A., Shibata, E., Anderson, M.E., and Mohler, P.J. (2008). Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *The Journal of cell biology* 180, 173-186.
- Lu, T., Lee, H.C., Kabat, J.A., and Shibata, E.F. (1999). Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit. *The Journal of physiology* 518 ( Pt 2), 371-384.
- Ma, D., and Jan, L.Y. (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Current opinion in neurobiology* 12, 287-292.
- Magalhaes, M.A., Larson, D.R., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Gil-Henn, H., Oser, M., Chen, X., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2011). Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. *The Journal of cell biology* 195, 903-920.
- Makita, N., Bennett, P.B., and George, A.L., Jr. (1996). Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 16, 7117-7127.
- Malhotra, J.D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *The Journal of biological chemistry* 275, 11383-11388.
- Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2002). Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *The Journal of biological chemistry* 277, 26681-26688.
- Malhotra, J.D., Thyagarajan, V., Chen, C., and Isom, L.L. (2004). Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 40748-40754.
- Maschietto, M., Girardi, S., Dal Maschio, M., Scorzeto, M., and Vassanelli, S. (2013). Sodium channel beta2 subunit promotes filopodia-like processes and expansion of the dendritic tree in developing rat hippocampal neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 2.

- McCormick, K.A., Isom, L.L., Ragsdale, D., Smith, D., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1998). Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 273, 3954-3962.
- McEwen, D.P., and Isom, L.L. (2004). Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *The Journal of biological chemistry* 279, 52744-52752.
- McEwen, D.P., Meadows, L.S., Chen, C., Thyagarajan, V., and Isom, L.L. (2004). Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *The Journal of biological chemistry* 279, 16044-16049.
- McLemore, T.L., Liu, M.C., Blacker, P.C., Gregg, M., Alley, M.C., Abbott, B.J., Shoemaker, R.H., Bohlman, M.E., Litterst, C.C., Hubbard, W.C., *et al.* (1987). Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer research* 47, 5132-5140.
- Meadows, L., Malhotra, J.D., Stetzer, A., Isom, L.L., and Ragsdale, D.S. (2001). The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *Journal of neurochemistry* 76, 1871-1878.
- Meadows, L.S., Malhotra, J., Loukas, A., Thyagarajan, V., Kazen-Gillespie, K.A., Koopman, M.C., Kriegler, S., Isom, L.L., and Ragsdale, D.S. (2002). Functional and biochemical analysis of a sodium channel beta1 subunit mutation responsible for generalized epilepsy with febrile seizures plus type 1. *J Neurosci* 22, 10699-10709.
- Mebs, D., and Schmidt, K. (1989). Occurrence of tetrodotoxin in the frog *Atelopus oxyrhynchus*. *Toxicon* 27, 819-822.
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D.J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M.T., *et al.* (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134-142.
- Mercier, A., Clement, R., Harnois, T., Bourmeyster, N., Faivre, J.F., Findlay, I., Chahine, M., Bois, P., and Chatelier, A. (2012). The beta1-subunit of Na(v)1.5 cardiac sodium channel is required for a dominant negative effect through alpha-alpha interaction. *PloS one* 7, e48690.
- Miyazaki, H., Oyama, F., Wong, H.K., Kaneko, K., Sakurai, T., Tamaoka, A., and Nukina, N. (2007). BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochemical and biophysical research communications* 361, 43-48.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews* 6, 764-775.
- Mohler, P.J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S.G., and Bennett, V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17533-17538.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K., *et al.* (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2308-2313.
- Mori, M., Konno, T., Morii, T., Nagayama, K., and Imoto, K. (2003). Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe. *Biochemical and biophysical research communications* 307, 290-296.
- Morris, C.E., and Juranka, P.F. (2007). Nav channel mechanosensitivity: activation and inactivation accelerate reversibly with stretch. *Biophysical journal* 93, 822-833.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, 263-273.

- Murphy, B.J., Rogers, J., Perdichizzi, A.P., Colvin, A.A., and Catterall, W.A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the alpha subunit of the cardiac sodium channel. *The Journal of biological chemistry* 271, 28837-28843.
- Murray, K.T., Hu, N.N., Daw, J.R., Shin, H.G., Watson, M.T., Mashburn, A.B., and George, A.L., Jr. (1997). Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation research* 80, 370-376.
- Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L.C., and Brackenbury, W.J. (2014). The sodium channel beta1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis. *International journal of cancer* 135, 2338-2351.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M., and Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322, 826-828.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., *et al.* (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and Stuhmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS letters* 259, 213-216.
- Norenberg, W., Illes, P., and Gebicke-Haerter, P.J. (1994). Sodium channel in isolated human brain macrophages (microglia). *Glia* 10, 165-172.
- O'Malley, H.A., Shreiner, A.B., Chen, G.H., Huffnagle, G.B., and Isom, L.L. (2009). Loss of Na<sup>+</sup> channel beta2 subunits is neuroprotective in a mouse model of multiple sclerosis. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 143-155.
- Ogiwara, I., Nakayama, T., Yamagata, T., Ohtani, H., Mazaki, E., Tsuchiya, S., Inoue, Y., and Yamakawa, K. (2012). A homozygous mutation of voltage-gated sodium channel beta(I) gene SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *Epilepsia* 53, e200-203.
- Olesen, M.S., Holst, A.G., Svendsen, J.H., Haunso, S., and Tfelt-Hansen, J. (2012). SCN1Bb R214Q found in 3 patients: 1 with Brugada syndrome and 2 with lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 9, 770-773.
- Olesen, M.S., Jespersen, T., Nielsen, J.B., Liang, B., Moller, D.V., Hedley, P., Christiansen, M., Varro, A., Olesen, S.P., Haunso, S., *et al.* (2011). Mutations in sodium channel beta-subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Cardiovascular research* 89, 786-793.
- Onkal, R., Mattis, J.H., Fraser, S.P., Diss, J.K., Shao, D., Okuse, K., and Djamgoz, M.B. (2008). Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *Journal of cellular physiology* 216, 716-726.
- Oser, M., and Condeelis, J. (2009). The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *Journal of cellular biochemistry* 108, 1252-1262.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *The Journal of cell biology* 186, 571-587.
- Ou, Y., Strege, P., Miller, S.M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S.J., and Farrugia, G. (2003). Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *The Journal of biological chemistry* 278, 1915-1923.
- Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Becquet, C., Machida, Y., Kaneko, K., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kurosawa, M., Ikeda, T., *et al.* (2006). Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *Journal of neurochemistry* 98, 518-529.
- Palmer, C.P., Mycielska, M.E., Burcu, H., Osman, K., Collins, T., Beckerman, R., Perrett, R., Johnson, H., Aydar, E., and Djamgoz, M.B. (2008). Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression. *Eur Biophys J* 37, 359-368.

- Pancrazio, J.J., Viglione, M.P., Tabbara, I.A., and Kim, Y.I. (1989). Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells. *Cancer research* 49, 5901-5906.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., and Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 63-71.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* 3, 187-197.
- Patino, G.A., Brackenbury, W.J., Bao, Y., Lopez-Santiago, L.F., O'Malley, H.A., Chen, C., Calhoun, J.D., Lafreniere, R.G., Cossette, P., Rouleau, G.A., *et al.* (2011). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel beta1B: a secreted cell adhesion molecule involved in human epilepsy. *J Neurosci* 31, 14577-14591.
- Patino, G.A., Claes, L.R., Lopez-Santiago, L.F., Slat, E.A., Dondeti, R.S., Chen, C., O'Malley, H.A., Gray, C.B., Miyazaki, H., Nukina, N., *et al.* (2009). A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J Neurosci* 29, 10764-10778.
- Patino, G.A., and Isom, L.L. (2010). Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na<sup>+</sup> channel beta subunits in development and disease. *Neuroscience letters* 486, 53-59.
- Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P., and French, R.J. (2005). The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel. *Biophysical journal* 89, 232-242.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353-358.
- Petitprez, S., Zmoos, A.F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S.E., *et al.* (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circulation research* 108, 294-304.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research* 44, 655-667.
- Pille, J.Y., Denoyelle, C., Varet, J., Bertrand, J.R., Soria, J., Opolon, P., Lu, H., Pritchard, L.L., Vannier, J.P., Malvy, C., *et al.* (2005). Anti-RhoA and anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 11, 267-274.
- Pinner, S., and Sahai, E. (2008). Imaging amoeboid cancer cell motility *in vivo*. *Journal of microscopy* 231, 441-445.
- Plassart, E., Reboul, J., Rime, C.S., Recan, D., Millasseau, P., Eymard, B., Pelletier, J., Thomas, C., Chapon, F., Desnuelle, C., *et al.* (1994). Mutations in the muscle sodium channel gene (SCN4A) in 13 French families with hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: phenotype to genotype correlations and demonstration of the predominance of two mutations. *Eur J Hum Genet* 2, 110-124.
- Pollard, J.W. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of leukocyte biology* 84, 623-630.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews* 4, 71-78.
- Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in pharmacology* 2, 49.
- 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. *Molecular cancer therapeutics* 5, 2946-2953.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):107-21
- Prevarskaya, N., Zhang, L., and Barritt, G. (2007). TRP channels in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1772, 937-946.
- Qin, N., D'Andrea, M.R., Lubin, M.L., Shafae, N., Codd, E.E., and Correa, A.M. (2003). Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 4762-4770.

- Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Modulation of cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 3289-3293.
- Qu, Y., Rogers, J.C., Tanada, T.N., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (1996). Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *The Journal of general physiology* *108*, 375-379.
- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science (New York, NY)* *265*, 1724-1728.
- Ratcliffe, C.F., Westenbroek, R.E., Curtis, R., and Catterall, W.A. (2001). Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of cell biology* *154*, 427-434.
- Rathor, N., Zhuang, R., Wang, J.Y., Donahue, J.M., Turner, D.J., and Rao, J.N. (2014). Src-mediated caveolin-1 phosphorylation regulates intestinal epithelial restitution by altering Ca(2<sup>+</sup>) influx after wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *306*, G650-658.
- Reid, C.A., Leaw, B., Richards, K.L., Richardson, R., Wimmer, V., Yu, C., Hill-Yardin, E.L., Lerche, H., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., *et al.* (2014). Reduced dendritic arborization and hyperexcitability of pyramidal neurons in a Scn1b-based model of Dravet syndrome. *Brain* *137*, 1701-1715.
- Riuro, H., Beltran-Alvarez, P., Tarradas, A., Selga, E., Campuzano, O., Verges, M., Pagans, S., Iglesias, A., Brugada, J., Brugada, P., *et al.* (2013). A missense mutation in the sodium channel beta2 subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Human mutation* *34*, 961-966.
- Roger, S., Besson, P., and Le Guennec, J.Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et biophysica acta* *1616*, 107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., and Le Guennec, J.Y. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The international journal of biochemistry & cell biology* *39*, 774-786.
- Rohl, C.A., Boeckman, F.A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Klevit, R.E. (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* *38*, 855-861.
- Rook, M.B., Evers, M.M., Vos, M.A., and Bierhuizen, M.F. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular research* *93*, 12-23.
- Roselli, F., Livrea, P., and Jirillo, E. (2006). Voltage-gated sodium channel blockers as immunomodulators. *Recent patents on CNS drug discovery* *1*, 83-91.
- Rougier, J.S., van Bemmelen, M.X., Bruce, M.C., Jespersen, T., Gavillet, B., Apotheloz, F., Cordonier, S., Staub, O., Rotin, D., and Abriel, H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* *288*, C692-701.
- Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H.L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* *10*, 311-320.
- Rush, A.M., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2005). Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *The Journal of physiology* *564*, 803-815.
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics & development* *15*, 87-96.
- Saint, D.A. (2006). The role of the persistent Na(+) current during cardiac ischemia and hypoxia. *Journal of cardiovascular electrophysiology* *17 Suppl 1*, S96-S103.

- Sangameswaran, L., Delgado, S.G., Fish, L.M., Koch, B.D., Jakeman, L.B., Stewart, G.R., Sze, P., Hunter, J.C., Eglén, R.M., and Herman, R.C. (1996). Additions and Corrections to Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *The Journal of biological chemistry* *271*, 13292A-13292.
- Sano, K., Mitsunaga, M., Nakajima, T., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2012). *In vivo* breast cancer characterization imaging using two monoclonal antibodies activatably labeled with near infrared fluorophores. *Breast Cancer Res* *14*, R61.
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R.S., Wang, Y.X., McCallum, J., and Wenthold, R.J. (2001). Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* *21*, 7506-7516.
- Sarhan, M.F., Van Petegem, F., and Ahern, C.A. (2009). A double tyrosine motif in the cardiac sodium channel domain III-IV linker couples calcium-dependent calmodulin binding to inactivation gating. *The Journal of biological chemistry* *284*, 33265-33274.
- Satin, J., Kyle, J.W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L.L., Fozzard, H.A., and Rogart, R.B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science (New York, NY)* *256*, 1202-1205.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* *409*, 1047-1051.
- Sato, P.Y., Coombs, W., Lin, X., Nekrasova, O., Green, K.J., Isom, L.L., Taffet, S.M., and Delmar, M. (2011). Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation research* *109*, 193-201.
- Sato, P.Y., Musa, H., Coombs, W., Guerrero-Serna, G., Patino, G.A., Taffet, S.M., Isom, L.L., and Delmar, M. (2009). Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circulation research* *105*, 523-526.
- Scheffer, I.E., Harkin, L.A., Grinton, B.E., Dibbens, L.M., Turner, S.J., Zielinski, M.A., Xu, R., Jackson, G., Adams, J., Connellan, M., *et al.* (2007). Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain* *130*, 100-109.
- Schonherr, R. (2005). Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *The Journal of membrane biology* *205*, 175-184
- Schreibmayer, W., Dascal, N., Lotan, I., Wallner, M., and Weigl, L. (1991). Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel alpha-subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS letters* *291*, 341-344.
- Schreibmayer, W., Frohnwieser, B., Dascal, N., Platzer, D., Spreitzer, B., Zechner, R., Kallen, R.G., and Lester, H.A. (1994). Beta-adrenergic modulation of currents produced by rat cardiac Na<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Receptors & channels* *2*, 339-350.
- Schwab, A., Wulf, A., Schulz, C., Kessler, W., Nechyporuk-Zloy, V., Romer, M., Reinhardt, J., Weinhold, D., Dieterich, P., Stock, C., *et al.* (2006). Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *Journal of cellular physiology* *206*, 86-94.
- Schwickert, G., Walenta, S., Sundfor, K., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (1995). Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer research* *55*, 4757-4759.
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* *271*, 32529-32537.
- Shah, B.S., Stevens, E.B., Gonzalez, M.I., Bramwell, S., Pinnock, R.D., Lee, K., and Dixon, A.K. (2000). beta3, a novel auxiliary subunit for the voltage-gated sodium channel, is expressed preferentially in sensory neurons and is upregulated in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *The European journal of neuroscience* *12*, 3985-3990.

- Shao, D., Okuse, K., and Djamgoz, M.B. (2009). Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* *41*, 1471-1481.
- Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., Kester, J.C., Garfall, A.L., Simpson, K., Bell-McGuinn, K.M., Zabor, E.C., Brogi, E., and Joyce, J.A. (2011) Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes & development* *25*, 2465-2479
- Simon, M.C. (2006). Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* *3*, 150-151.
- Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A.N., Moss, S., and Wood, J.N. (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS letters* *409*, 49-52.
- Smith, P., Rhodes, N.P., Shortland, A.P., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B., Ke, Y., and Foster, C.S. (1998). Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS letters* *423*, 19-24.
- Spampanato, J., Kearney, J.A., de Haan, G., McEwen, D.P., Escayg, A., Aradi, I., MacDonald, B.T., Levin, S.I., Soltesz, I., Benna, P., *et al.* (2004). A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J Neurosci* *24*, 10022-10034.
- Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W.A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15753-15757.
- Strong, M., Chandy, K.G., and Gutman, G.A. (1993). Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Molecular biology and evolution* *10*, 221-242.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* *339*, 597-603.
- Sugimoto, T., Yoshino, M., Nagao, M., Ishii, S., and Yabu, H. (1996). Voltage-gated ionic channels in cultured rabbit articular chondrocytes. *Comparative biochemistry and physiology* *115*, 223-232.
- Tan, B.H., Pundi, K.N., Van Norstrand, D.W., Valdivia, C.R., Tester, D.J., Medeiros-Domingo, A., Makielski, J.C., and Ackerman, M.J. (2010). Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel beta subunits. *Heart Rhythm* *7*, 771-778.
- Tan, G., Sun, S.Q., and Yuan, D.L. (2008). Expression of Kir 4.1 in human astrocytic tumors: correlation with pathologic grade. *Biochemical and biophysical research communications* *367*, 743-747.
- Tan, H.L., Kupersmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D.M., Wilde, A.A., Anderson, M.E., and Balsler, J.R. (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* *415*, 442-447.
- Tateyama, M., Kurokawa, J., Terrenoire, C., Rivolta, I., and Kass, R.S. (2003). Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels. *Circulation* *107*, 3216-3222.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., and Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS letters* *293*, 93-96.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews* *2*, 442-454.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871-890.
- Thompson, E.W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M.E., *et al.* (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal of cellular physiology* *150*, 534-544.

- Thomsen, W., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., and Catterall, W.A. (1995). Reconstitution of high-affinity binding of a beta-scorpion toxin to neurotoxin receptor site 4 on purified sodium channels. *Journal of neurochemistry* 65, 1358-1364.
- Tombola, F., Pathak, M.M., and Isacoff, E.Y. (2006). How does voltage open an ion channel? *Annual review of cell and developmental biology* 22, 23-52.
- Traub, O., Ishida, T., Ishida, M., Tupper, J.C., and Berk, B.C. (1999). Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. *The Journal of biological chemistry* 274, 20144-20150.
- Tzoumaka, E., Tischler, A.C., Sangameswaran, L., Eglén, R.M., Hunter, J.C., and Novakovic, S.D. (2000). Differential distribution of the tetrodotoxin-sensitive rPN4/NaCh6/Scn8a sodium channel in the nervous system. *Journal of neuroscience research* 60, 37-44.
- Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D.J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9355-9360.
- Urbano, F.J., Sierra, F., Colombo, J.A., Velasco, J.M., and Buno, W. (1997). Different voltage-gated sodium currents are expressed by human neuroblastoma NB69 cells when cultured in defined serum-free and in astroglial-conditioned media. *Glia* 19, 161-170.
- Valdivia, C.R., Ueda, K., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *American journal of physiology* 297, H1446-1452.
- van Bemmelen, M.X., Rougier, J.S., Gavillet, B., Apotheloz, F., Daidie, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M.A., Kass, R.S., Staub, O., *et al.* (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation research* 95, 284-291.
- van den Boogaard, M., Wong, L.Y., Tessadori, F., Bakker, M.L., Dreizehnter, L.K., Wakker, V., Bezzina, C.R., t Hoen, P.A., Bakkers, J., Barnett, P., *et al.* (2012). Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *The Journal of clinical investigation* 122, 2519-2530.
- van Gassen, K.L., de Wit, M., van Kempen, M., van der Hel, W.S., van Rijen, P.C., Jackson, A.P., Lindhout, D., and de Graan, P.N. (2009). Hippocampal Nalpha3 expression in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 50, 957-962.
- van Stuijvenberg, L., Yildirim, C., Kok, B.G., van Veen, T.A., Varro, A., Winckels, S.K., Vos, M.A., and Bierhuizen, M.F. (2010). Alternative promoter usage and splicing of the human SCN5A gene contribute to transcript heterogeneity. *DNA and cell biology* 29, 577-587.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, NY)* 324, 1029-1033.
- Vassilev, P.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science (New York, NY)* 241, 1658-1661.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer research* 71, 2550-2560.
- Vijayaragavan, K., Powell, A.J., Kinghorn, I.J., and Chahine, M. (2004). Role of auxiliary beta1-, beta2-, and beta3-subunits and their interaction with Na(v)1.8 voltage-gated sodium channel. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 531-540.
- Vila-Carriles, W.H., Kovacs, G.G., Jovov, B., Zhou, Z.H., Pahwa, A.K., Colby, G., Esimai, O., Gillespie, G.Y., Mapstone, T.B., Markert, J.M., *et al.* (2006). Surface expression of ASIC2 inhibits the amiloride-sensitive current and migration of glioma cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 19220-19232.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E.C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S.K., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J.H., *et al.* (2006). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *The Journal of clinical investigation* 116, 3127-3138.

- Wagner, S., Ruff, H.M., Weber, S.L., Bellmann, S., Sowa, T., Schulte, T., Anderson, M.E., Grandi, E., Bers, D.M., Backs, J., *et al.* (2011). Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II $\delta$  is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circulation research* 108, 555-565.
- Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J.F., Mitze, M., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (1997). Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *The American journal of pathology* 150, 409-415.
- Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer research* 60, 916-921.
- Wallace, R.H., Scheffer, I.E., Parasivam, G., Barnett, S., Wallace, G.B., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F., and Mulley, J.C. (2002). Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* 58, 1426-1429.
- Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L., Jr., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., *et al.* (1998). Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nature genetics* 19, 366-370.
- Wang, G.K., and Wang, S.Y. (2003). Veratridine block of rat skeletal muscle Nav1.4 sodium channels in the inner vestibule. *The Journal of physiology* 548, 667-675.
- Wang, J., Yarov-Yarovoy, V., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2011). Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na<sup>+</sup> channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15426-15431.
- Wang, P., Yang, Q., Wu, X., Yang, Y., Shi, L., Wang, C., Wu, G., Xia, Y., Yang, B., Zhang, R., *et al.* (2010). Functional dominant-negative mutation of sodium channel subunit gene SCN3B associated with atrial fibrillation in a Chinese GeneID population. *Biochemical and biophysical research communications* 398, 98-104.
- Wang, W., Smith, R., 3rd, Burghardt, R., and Safe, S.H. (1997). 17 beta-Estradiol-mediated growth inhibition of MDA-MB-468 cells stably transfected with the estrogen receptor: cell cycle effects. *Molecular and cellular endocrinology* 133, 49-62.
- Wang, Z., Takemori, H., Halder, S.K., Nonaka, Y., and Okamoto, M. (1999). Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS letters* 453, 135-139.
- Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D.W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B.S., Kannankeril, P.J., and Roden, D.M. (2009). Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 268-275.
- Watanabe, H., Koopmann, T.T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C.R., Schott, J.J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., *et al.* (2008). Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *The Journal of clinical investigation* 118, 2260-2268.
- Weaver, A.M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis* 23, 97-105.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457, 901-905.
- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>(+)</sup>-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10910-10914.
- Wingo, T.L., Shah, V.N., Anderson, M.E., Lybrand, T.P., Chazin, W.J., and Balsler, J.R. (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nature structural & molecular biology* 11, 219-225.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Brocker, E.B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-

- amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology* 160, 267-277.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry* 280, 23009-23017.
- Wright, M., Grim, J., Deshane, J., Kim, M., Strong, T.V., Siegal, G.P., and Curiel, D.T. (1997). An intracellular anti-erbB-2 single-chain antibody is specifically cytotoxic to human breast carcinoma cells overexpressing erbB-2. *Gene therapy* 4, 317-322.
- Wu, L., Yong, S.L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., Zhang, X., Obejero-Paz, C.A., Rho, H.J., Ke, T., *et al.* (2008). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *The Journal of biological chemistry* 283, 6968-6978.
- Xiao, Y.F., Wright, S.N., Wang, G.K., Morgan, J.P., and Leaf, A. (2000). Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na(+) channels. *American journal of physiology* 279, H35-46.
- Xiao, Z.C., Ragsdale, D.S., Malhotra, J.D., Mattei, L.N., Braun, P.E., Schachner, M., and Isom, L.L. (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *The Journal of biological chemistry* 274, 26511-26517.
- Xu, R., Thomas, E.A., Gazina, E.V., Richards, K.L., Quick, M., Wallace, R.H., Harkin, L.A., Heron, S.E., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., *et al.* (2007). Generalized epilepsy with febrile seizures plus-associated sodium channel beta1 subunit mutations severely reduce beta subunit-mediated modulation of sodium channel function. *Neuroscience* 148, 164-174.
- Yamaguchi, H., Takeo, Y., Yoshida, S., Kouchi, Z., Nakamura, Y., and Fukami, K. (2009). Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer research* 69, 8594-8602.
- Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer science* 96, 379-386.
- Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., and Brackenbury, W.J. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 134, 603-615.
- Yang, P., Kupersmidt, S., and Roden, D.M. (2004). Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovascular research* 61, 56-65.
- Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer cell* 15, 124-134.
- Yereddi, N.R., Cusdin, F.S., Namadurai, S., Packman, L.C., Monie, T.P., Slavny, P., Clare, J.J., Powell, A.J., and Jackson, A.P. (2013). The immunoglobulin domain of the sodium channel beta3 subunit contains a surface-localized disulfide bond that is required for homophilic binding. *Faseb J* 27, 568-580.
- Yildirim, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A., and Djamgoz, M.B. (2012). Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis *in vivo*. *Cancer letters* 323, 58-61.
- Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome biology* 4, 207.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., *et al.* (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23, 7577-7585.
- Yuan, L., Koivumaki, J.T., Liang, B., Lorentzen, L.G., Tang, C., Andersen, M.N., Svendsen, J.H., Tfelt-Hansen, J., Maleckar, M., Schmitt, N., *et al.* (2014). Investigations of the Navbeta1b sodium channel subunit in human ventricle; functional characterization of the H162P Brugada syndrome mutant. *American journal of physiology* 306, H1204-1212.
- Zeng, L., Si, X., Yu, W.P., Le, H.T., Ng, K.P., Teng, R.M., Ryan, K., Wang, D.Z., Ponniah, S., and Pallen, C.J. (2003). PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and

- cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *The Journal of cell biology* 160, 137-146.
- Zhang, J.Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., and Catterall, W.A. (2011). Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *The Journal of biological chemistry* 286, 33641-33651.
- Zhang, Z.N., Li, Q., Liu, C., Wang, H.B., Wang, Q., and Bao, L. (2008). The voltage-gated Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the beta3 subunit. *Journal of cell science* 121, 3243-3252.
- Zhao, J., O'Leary, M.E., and Chahine, M. (2011). Regulation of Nav1.6 and Nav1.8 peripheral nerve Na<sup>+</sup> channels by auxiliary beta-subunits. *Journal of neurophysiology* 106, 608-619.
- Zhao, P., Barr, T.P., Hou, Q., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Albrecht, P.J., Petersen, K., Eisenberg, E., Wymer, J.P., Rice, F.L., *et al.* (2008). Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain. *Pain* 139, 90-105.
- Zhou, J., Shin, H.G., Yi, J., Shen, W., Williams, C.P., and Murray, K.T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circulation research* 91, 540-546.
- Ziane, R., Huang, H., Moghadaszadeh, B., Beggs, A.H., Levesque, G., and Chahine, M. (2010). Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry* 49, 166-178.
- Zimmer, T., Biskup, C., Dugarmaa, S., Vogel, F., Steinbis, M., Bohle, T., Wu, Y.S., Dumaine, R., and Benndorf, K. (2002). Functional expression of GFP-linked human heart sodium channel (hH1) and subcellular localization of the  $\alpha$  subunit in HEK293 cells and dog cardiac myocytes. *The Journal of membrane biology* 186, 1-12.
- Zsiros, E., Kis-Toth, K., Hajdu, P., Gaspar, R., Bielanska, J., Felipe, A., Rajnavolgyi, E., and Panyi, G. (2009). Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J Immunol* 183, 4483-4492.
- Zuo, L., Ushio-Fukai, M., Ikeda, S., Hilenski, L., Patrushev, N., and Alexander, R.W. (2005). Caveolin-1 is essential for activation of Rac1 and NAD(P)H oxidase after angiotensin II type 1 receptor stimulation in vascular smooth muscle cells: role in redox signaling and vascular hypertrophy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1824-1830.

# Rôle du canal sodique $\text{Na}_v1.5$ et de la sous-unité auxiliaire $\beta4$ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*

## Résumé

L'expression anormale du canal sodique  $\text{Na}_v1.5$  dans le cancer du sein est corrélée au développement métastatique et à une mortalité augmentée. Le canal  $\text{Na}_v1.5$  est localisé dans les invadopodes des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 et augmente leur activité protéolytique par une modulation allostérique de l'échangeur NHE-1 et l'activation de protéases acides. *In vivo*, dans un modèle de xénogreffe sur souris NMRI nude, l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  potentialise la colonisation des poumons par les cellules cancéreuses mammaires humaines. Cette colonisation métastatique est inhibée par un traitement à la ranolazine, un inhibiteur pharmacologique des canaux  $\text{Na}_v1.5$ . La sous-unité  $\beta4$ , auxiliaire des canaux  $\text{Na}_v$ , voit son expression diminuée au cours de la progression cancéreuse, ce qui est associé *in vitro* à une augmentation de l'invasivité cellulaire. Cette augmentation d'invasivité semble indépendante du canal  $\text{Na}_v1.5$  et pourrait être associée à une transition des cellules vers un phénotype amiboïde. En conclusion, l'expression de  $\text{Na}_v1.5$  et la perte d'expression de  $\beta4$  semblent jouer des rôles complémentaires dans l'invasivité des cellules cancéreuses.

**Mots clés :** canaux sodiques dépendants du voltage, sous-unité auxiliaire  $\beta4$ , matrice extracellulaire, invasivité cellulaire *in vitro*, métastases

## Summary

The abnormal expression of sodium channel  $\text{Na}_v1.5$  in breast cancer is correlated with metastatic development and an increased mortality. The  $\text{Na}_v1.5$  channel is located in invadopodia in human breast cancer cells MDA-MB-231, where it increases proteolytic activity by allosteric modulation of exchanger NHE-1 and activation of acidic proteases. *In vivo*, in a xenograft model in nude NMRI mice, the expression of  $\text{Na}_v1.5$  potentiates lung colonization by human breast cancer cells. Metastatic colonization is inhibited by treatment with ranolazine, a pharmacological inhibitor of  $\text{Na}_v1.5$ . The  $\beta4$  subunit, an auxiliary subunit of  $\text{Na}_v$  channels, is expressed at low levels or lost when tumors are more aggressive, and its suppression *in vitro* increases cell invasiveness. This increase seems to be independent of  $\text{Na}_v1.5$  and could be associated with the transition of cells to an amoeboid phenotype. In conclusion,  $\text{Na}_v1.5$  expression and the loss of  $\beta4$  expression seem to play complementary roles in the invasiveness of cancer cells.

**Keywords:** voltage-gated sodium channels, auxiliary  $\beta4$  subunit, extracellular matrix, *in vitro* invasiveness, metastasis