UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

UNITÉ INSERM U1069 Nutrition Croissance et Cancer

THÈSE présentée par :

Lucie BRISSON

soutenue le : **19 octobre 2012**

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

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

Modulation de l'échangeur Na^+/H^+ de type 1 (NHE1) par le canal sodique dépendant du voltage $Na_V1.5$

Implication dans l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires humaines

THÈSE dirigée par :

M. GORÉ Jacques	Professeur des Universités, Université François – Rabelais de Tours
M. ROGER Sébastien	Maître de Conférences-HDR, Université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mme LAGADIC-GOSSMANN Dominique	Directeur de recherche CNRS, Rennes
M. VAN COPPENOLLE Fabien	Professeur des Universités, Université Lyon 1

JURY :

M. CHAVRIER Philippe	Directeur de recherche CNRS, Paris
M. COUNILLON Laurent	Professeur des Universités, Université Nice-Sophia Antipolis
M. GORÉ Jacques	Professeur des Universités, Université de Tours
Mme LAGADIC-GOSSMANN Dominique	Directeur de recherche CNRS, Rennes
M. ROGER Sébastien	Maître de Conférences-HDR, Université de Tours
M. SCHWAB Albrecht	Professeur, Université de Münster, Allemagne
M. VAN COPPENOLLE Fabien	Professeur des Universités, Université de Lyon 1

Remerciements

Au terme de ce travail, c'est avec émotion et, certes, un peu de nostalgie que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse le Pr. Jacques Goré et le Dr. Sébastien Roger qui ont dirigé et encadré cette thèse pendant ces trois années. Merci à Jacques Goré de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire depuis mon premier stage en Licence et de m'avoir fait confiance pour continuer ce projet. Merci de m'avoir initié à la régulation du pH et de m'avoir fait partager de nombreux conseils lors de toutes ces années et pendant l'écriture de ce manuscrit. Merci à Sébastien Roger de m'avoir fait partager ses nombreuses connaissances sur les canaux ioniques, de m'avoir permis de voyager pour présenter ces travaux et d'avoir eu sans cesse de nouvelles idées pour poursuivre le projet. Merci pour votre disponibilité et pour la confiance, la liberté et les précieux conseils que vous m'avez apporté durant ces trois années de thèse et qui m'ont permis d'affiner mes connaissances de la recherche et mon projet professionnel.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements au Dr. Dominique Lagadic-Gossmann, au Pr. Fabien Van Coppenolle, au Dr. Philippe Chavrier, au Pr. Laurent Counillon et au Pr. Albrecht Schwab de me faire l'honneur de juger ce travail de 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 et mon travail de thèse au sein du laboratoire.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe d'enseignement de biochimie de la Faculté des Sciences dont j'ai fait partie pendant ces trois dernières années. Merci au Pr. Fréderic Esnard, au Pr. Gilles Lalmanach, au Pr. Thierry Moreau, au Dr. Sylvie Attucci, au Dr. Sandrine Dallet-Choisy, au Dr Fabien Lecaille, Dr. Lydie Nadal-Desbarats, au Dr. Thomas Baranek, au Dr. Marie-Louise Zani, au Dr. Audrey Munos et à Fabien Barbarin, Marilou Fauquet et Fabienne Geoffroy pour toute leur aide pendant les travaux dirigés et les travaux pratiques que j'ai effectué pendant cette thèse. J'ai également une pensée pour mes camarades d'enseignement Alice et Marion qui devraient également terminer leur thèse prochainement.

Je tiens à remercier le Pr. Stephan J. Reshkin de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour m'initier aux techniques d'étude des invadopodes. Merci à lui et à toute son équipe pour leur accueil chaleureux et de m'avoir fait découvrir la culture italienne.

Je souhaite également remercier le Pr. Laurent Counillon pour son accueil dans son laboratoire qui m'a permis de découvrir ses techniques de mesure d'activité de NHE1 ainsi qu'à toute son équipe que j'ai côtoyé pendant la courte semaine que j'ai passé à Nice.

Merci au laboratoire INSERM U 966 « Morphogenèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites » de m'avoir permis d'utiliser l'ultra-centrifugeuse sans laquelle je n'aurais pû effectuer une partie de mes expériences.

Merci à Marie-Lise Jourdan de m'avoir initié à la détection des cellules apoptotiques et à la cytométrie en flux.

Je tiens également à remercier le Pr. Jean-Yves Le Guennec pour ses cours et ses conseils qui m'ont donné envie de venir au laboratoire et de faire de la recherche. Merci de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire en me proposant un projet de stage.

Enfin, un énorme merci à tous les membres de l'unité Inserm U1069 pour la bonne ambiance qui règne au laboratoire et qui fait qu'il est tellement agréable de venir travailler au laboratoire. Merci à tous pour votre bonne humeur, votre aide et vos conseils qui m'ont énormément aidé pendant cette thèse :

à Catherine Leroy notre secrétaire pour ta gentillesse, tes blagues envoyées par mails et tes cakes au citron.

à Isabelle Domingo pour avoir su prendre soin de mes cellules quand j'étais absente et pour ton aide précieuse lors de certaines expériences.

à Pierre Besson pour tous tes précieux conseils et ta disponibilité. Merci d'avoir toujours pris un peu de ton temps pour m'aider quand j'avais une question et d'avoir toujours trouvé une solution.

à Christophe Vandier pour tes conseils notamment pour l'après thèse.

aux anciennes du bureau 6 du 2ème Aurélie et Stéphanie pour les bons moments que nous avons pu partagé dans le bureau

et aux membres du bureau du 4ème que j'ai rejoint récemment Karine Mahéo, Caroline Goupille et Gunther Weber qui ont pu partager mes derniers moments de thèse.

aux anciens : Tran, Ludo et Alban de m'avoir intégré dans le laboratoire alors que j'étais encore « petite ». Merci pour toute votre aide, pour les déménagements, et tous les bons moments passés avec vous au laboratoire ou en dehors. Merci notamment à Alban et Ludo de m'avoir fait découvrir votre annexe chez Martine et à Stéphanie et Emeline de toujours m'y accompagner.

à Virginie, dernière représentante de l'équipe Na_V. Tout repose sur toi maintenant mais je suis sure que tu vas y arriver.

à Marie, Aurélie, Christophe, Romain, Ludo et Stéphan pour cette soirée mémorable à Biotechnocentre

à mes co-thésards : Sophie, Mimsy, Joan, Virginie, Lucie Cl, Bilel, Ramez, Laure, Lucie Ch, Fabio et Julie (post-doc) qui ont été mes compagnons de paillasse pendant ces trois années.

aux petits nouveaux qui commencent leur thèse Emeline, Maxime, et Audrey on compte sur vous pour la relève. Bonne chance et bon courage à vous pour la suite.

et à tous les membres du laboratoire Aurélie, Romain, Marie, Amandine, Michelle, Aurore, Jean-François, Stéphane

Et pour finir, merci à mes parents, mes frères, ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu et été présents pendant cette thèse. Merci à Toi pour ton soutien et pour tous les bons moments partagés et ceux à venir.

Résumé

La forte mortalité associée au cancer du sein est principalement due à la dissémination des cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire et à l'envahissement de nouveaux tissus. La formation de métastases à distance de la tumeur primaire est rendue possible grâce à certaines propriétés des cellules cancéreuses très agressives telles qu'une migration cellulaire suractivée associée à la capacité de dégrader les matrices extracellulaires. Il est proposé depuis quelques années que les canaux ioniques participent à ces propriétés des cellules cancéreuses invasives et à la formation de métastases.

La lignée de cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231 exprime un canal sodique dépendant du voltage fonctionnel, $Na_V1.5$, qui n'est pas retrouvé dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives ni dans des cellules mammaires non cancéreuses. La fonctionnalité de ce canal est associée à l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses MDA-MB-231 mais pas à leur migration ni à leur prolifération *in vitro*. Les cathepsines à cystéine B et S sont les principales protéases impliquées dans la protéolyse de la matrice extracellulaire dépendante du canal $Na_V1.5$. L'activité de ce canal induit une acidification péricellulaire qui est favorable à l'activité des cathepsines à cystéines B et S sécrétées dans l'environnement extracellulaire et connues pour avoir une activité maximale à pH acide.

L'étude de la régulation du pH des cellules MDA-MB-231 effectuée au cours de cette thèse, démontre que le principal régulateur de pH impliqué dans ces cellules est l'échangeur sodium-proton (NHE1). Ces deux protéines NHE1 et $Na_V1.5$ participent à l'invasivité et à la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire des cellules MDA-MB-231 dans une même proportion et leur inhibition simultanée n'a pas d'effet additif. Ces résultats suggèrent que $Na_V1.5$ et NHE1 participent à un même mécanisme conduisant à l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses. L'activité du canal $Na_V1.5$ ne régule pas l'expression en ARNm ni en protéine de NHE1 mais semble augmenter son activité, vraisemblablement par une augmentation de l'affinité de NHE1 pour les protons intracellulaires. Ceci conduisant à une augmentation de l'efflux de protons de NHE1 favorisant ainsi l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

Dans les cellules MDA-MB-231 $Na_V1.5$ et NHE1 sont co-localisés. Ces deux protéines sont plus précisément retrouvées dans des régions membranaires riches en cavéoline-1 et dans des

micro-domaines cellulaires spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasivité des cellules cancéreuses, les invadopodes. La localisation spécifique de $Na_V1.5$ et NHE1 dans ces zones membranaires spécialisées pourrait favoriser leur interaction fonctionnelle. L'activité de NHE1 ou de $Na_V1.5$ est requise pour la fonction de dégradation de la matrice extracellulaire par les invadopodes. De plus, l'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ entraine une modification de la morphologie des cellules cancéreuses avec une augmentation de leur index de circularité. Ce changement de morphologie s'accompagne d'une modification du niveau de phosphorylation de la cortactine et de la polymérisation de l'actine. L'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait, associée à l'activation de NHE1, stimuler la formation et l'activité des invadopodes par une phosphorylation de la cortactine et une réorganisation du cytosquelette d'actine et ainsi favoriser l'invasivité cellulaire.

Un complexe multi-protéique contenant $Na_V1.5$ et NHE1 pourrait donc exister dans les cellules cancéreuses hautement invasives permettant d'augmenter leur capacité de dégradation de la matrice extracellulaire grâce à des interactions protéiques ou à des voies de signalisation qu'il reste à identifier.

Mots clés : canaux sodiques dépendants du voltage, échangeurs sodium-proton, invadopodes, invasivité des cellules cancéreuses

Résumé en anglais

The high mortality rate associated with breast cancer is mainly due to dissemination of cancerous cells from primary tumour and invasion of new tissues. Metastasis formation at a distance from the primary tumour is made possible thanks to some properties of aggressive cancer cells as over activated cell migration associated with the ability to degrade extracellular matrixes. It has been hypothesized since many years that ion channels are involved in these properties of invasive cancerous cells and in metastasis formation.

The highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses a functional voltage-gated sodium channel, $Na_V1.5$, which is not found in poorly invasive breast cancer cell lines or in non cancerous mammary cells. This functional channel is involved in invasion of extracellular matrix by MDA-MB-231 cancerous cells but neither in their migration nor in their proliferation *in vitro*. The cysteine cathepsins B and S are the main proteases involved in $Na_V1.5$ channel dependant extracellular matrix proteolysis. The activity of this channel induced a pericellular acidification which is favourable for the activity of extracellularly released cysteine cathepsins B and S known to have a maximal activity at acidic pH.

The investigation of pH regulation in MDA-MB-231 cells during this thesis showed that the main pH regulator involved in these cells is the Na^+/H^+ exchanger NHE1. These two proteins NHE1 and $Na_V1.5$ are involved in MDA-MB-231 cells invasiveness and extracellular matrix proteolysis to the same extent and the simultaneous inhibition of both $Na_V1.5$ and NHE1 had no additive effect. This suggested that $Na_V1.5$ and NHE1 are involved in the same mechanism to drive extracellular matrix invasion by cancerous cells. The activity of $Na_V1.5$ channels don't regulate NHE1 mRNA or protein expression but seems to increase the activity of NHE1 possibly through an increase in affinity of NHE1 for intracellular protons. This led to an increase of H^+ efflux of NHE1 to favour MDA-MB-231 cell invasiveness.

In MDA-MB-231 cells $Na_V1.5$ and NHE1 are co-localised. These two proteins are more precisely found in cavéoline-1-rich membrane domains and in cellular micro-domains specialized in matrix degradation and cancer cells invasiveness, the invadopodia. The specific localization of $Na_V1.5$ and NHE1 in these specialized membrane areas could favour their functional interaction. The activity of NHE1 or $Na_V1.5$ is required for the extracellular matrix degradation by invadopodia. Furthermore the inhibition of $Na_V1.5$ activity induces a modification of cell morphology with an increase in circularity index. This morphology

change is associated with modification of cortactine phosphorylation and actin polymerisation. The activity of $Na_V1.5$ channels can, associated with NHE1 activation, promote invadopodia formation and activity through cortactin phosphorylation and actin cytoskeleton reorganization and favour cell invasiveness.

A multiprotein complex containing $Na_V1.5$ and NHE1 could exist in highly invasive cancerous cells to increase the proteolytic matrix degradation ability of these cells maybe through protein interactions or through signaling pathways that still have to be identified.

Key words: voltage-gated sodium channel, sodium-proton exchangers, invadopodia, cancer cells invasiveness

Table des matières

Remerciements 2
Résumé 5
Résumé en anglais 7
Table des matières 9
Liste des publications et des communications 13
Liste des tableaux 15
Liste des figures 16
Liste des abréviations 19
Introduction 21
Première partie Revue bibliographique 24
I. Biologie de la cellule cancéreuse : le cancer du sein 25
A. Généralités sur le cancer 25
1. Etymologie et historique 26
2. Epidémiologie 26
3. Facteurs de risque 27
4. Diagnostic et traitements 28
B. Le cancer du sein 29
1. Epidémiologie 29
2. Facteurs de risque 31
3. Le tissu mammaire normal et cancéreux 32
C. Histoire naturelle du cancer 34
1. Les trois étapes de la formation d'un cancer 35
2. Propriétés acquises par les cellules cancéreuses 37
D. Histoire naturelle du cancer du sein 41
E. Formation des métastases 42
1. Etapes de la formation des métastases 43
2. Migration et invasivité des cellules cancéreuses 47
3. Acteurs de l'invasion et rôle du microenvironnement 49
F. Métabolisme des cellules cancéreuses 55
II. Régulation du pH des cellules cancéreuses 62
A. pH des cellules cancéreuses 62
B. Rôle du pH des cellules cancéreuses 65

1. Rôle du pH intracellulaire 65
2. Rôle du pH extracellulaire dans la progression cancéreuse 66
C. Régulateurs du pH cellulaire 69
1. Echangeurs sodium-proton (NHE) 70
2. Pompe à protons de type vacuolaire (V-ATPase) 85
3. Transporteurs proton-lactate (MCT) 88
4. Formation et transport des ions bicarbonates (HCO_3^-) 90
D. Influence du pH et de ses régulateurs dans les invadopodes et podosomes 94
III. Canaux sodiques dépendants du voltage et invasivité des cellules cancéreuses 109
A. Canaux sodiques dépendants du voltage 109
1. Structure et fonctionnement 110
2. Pharmacologie 118
3. Régulation des canaux sodiques dépendants du voltage et implication physio-pathologique 120
B. Rôle des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules non excitables 126
1. Rôle physiologique dans les cellules non excitables 126
2. Rôle pathologique dans les cellules cancéreuses 127
Deuxième partie Matériel et méthodes 132
I. Techniques de culture cellulaire 133
A. Lignées cellulaires 133
B. Intérêts, limites et conditions nécessaires à la culture cellulaire 134
1. Intérêts et limites de la culture cellulaire 134
2. Conditions de culture cellulaire 135
3. Milieux de culture 136
4. Solutions utilisées pour mettre en suspension les cellules 136
5. Supports utilisés pour la culture cellulaire 137
6. Inhibiteurs pharmacologiques 138
C. Protocoles de culture cellulaire 139
1. Cryogénisation et décryogénisation des cellules 139
2. Mise en suspension et entretien des cellules 140
II. Techniques de biologie moléculaire 141
A. Analyse de l'expression des ARN messagers d'intérêts 141
1. Extraction des ARN totaux 141
2. Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire 142

3. Réaction de polymérisation en chaîne 142
B. Analyse de l'expression des protéines par western blotting 149
1. Extraction et dosage des protéines cellulaires 149
2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide et immuno-marquage 151
C. Co-Immunoprécipitation 155
D. Transfection transitoire par des ARN interférents 156
III. Etude des propriétés des cellules cancéreuses 157
A. Etude de la prolifération ou de la toxicité cellulaire 157
1. Test de viabilité cellulaire : MTT 157
2. Coloration des cellules au bleu de méthylène 158
B. Etude de la mort cellulaire par apoptose 158
C. Etude de la polymérisation de l'actine 159
D. Etude de la migration et de l'invasivité cellulaire *in vitro* 160
E. Etude de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire 162
IV. Mesures du pH intracellulaire et périmembranaire et de l'activité de l'échangeur sodium-proton 163
A. Mesure du pH intracellulaire et périmembranaire par spectrofluorimétrie 163
1. Mesure du pH intracellulaire 163
2. Mesure du pH périmembranaire 169
B. Mesure de l'activité de l'échangeur sodium-proton par l'influx de lithium intracellulaire 171
V. Electrophysiologie cellulaire : technique du patch clamp 175
A. Principe de la technique de patch clamp 175
B. Méthode 176
1. Installation du poste de patch clamp 176
2. Préparation des cellules, micropipettes et solutions 176
3. Mesure des courants ioniques en configuration cellule entière 177
VI. Techniques d'étude de localisation subcellulaire des protéines 179
A. Immunofluorescence 179
B. Isolement des radeaux lipidiques 180
C. Isolement des invadopodes 182
1. Fractionnement cellulaire 182
2. Identification des invadopodes par microscopie de fluorescence 185
D. Analyse des complexes protéiques par électrophorèse en condition non dénaturante 189

VII. Statistiques 190
Troisième partie Résultats et discussion 191
I. Le canal sodique $Na_V1.5$ stimule l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires en augmentant l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE1. 193
A. Introduction 193
B. Premières études sur la régulation du pH dans les cellules MDA-MB-231 195
C. Article 1 : $Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H^+ efflux in caveolae. 200
D. Résumé de l'article 1 210
E. Discussion 211
II. Localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les invadopodes 224
A. Introduction 224
B. Résultats préliminaires 225
C. Article 2 : Allosteric modulation of NHE-1 by $Na_V1.5$ sodium channels in caveolin-1 rich breast cancer cell invadopodia 229
D. Résumé de l'article 2 251
E. Discussion 252
Conclusions et perspectives 260
Publication non intégrée à la thèse 268
Bibliographie 292
Résumé 341
Résumé en anglais 341

Liste des publications et des communications

Publications intégrées à la thèse

BRISSON L., GILLET L., CALAGHAN S., BESSON P., LE GUENNEC J.-Y., ROGER S. & GORÉ J. 2011. $Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H^+ efflux in caveolae. *Oncogene*, 30, 2070-2076

BRISSON L., RESHKIN S.J., GORÉ J. & ROGER S. pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. *European Journal of Cell Biology*, sous presse.

BRISSON L., POET M., ANTELMI E., COUNILLON L., RESHKIN S.J., GORÉ J. & ROGER S. Allosteric modulation of NHE-1 by $Na_V1.5$ sodium channels in caveolin-1 rich breast cancer cell invadopodia. Article en préparation.

Publication non intégrée à la thèse

GILLET L., ROGER S., POTIER M., BRISSON L., VANDIER C, BESSON P & LE GUENNEC J.-Y. Voltage-gated sodium channels: New targets in cancer therapy? Frontiers in Medicinal Chemistry. 2010

Communications orales

BRISSON L. Le canal sodique $Na_V1.5$ stimule l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires via l'échangeur sodium-proton NHE1. Février 2012 - Laboratoire de Physio-Médecine Moléculaire FRE3472, Nice.

BRISSON L., ANTELMI E., DRIFFORT V., JELASSI B., GILLET L., BESSON P., GORE J., RESHKIN SJ. & ROGER S. $Na_V1.5$ sodium channels promote MDA-MB-231 human breast cancer cells invasiveness by increasing NHE1 activity in caveolin-rich lipid rafts. Septembre 2011 - Podosomes, Invadopodia and Focal Adhesions in Physiology and Pathology, Madrid, Espagne

BRISSON L., GILLET L., LE GUENNEC J-Y., BESSON P., GORE J. & ROGER S. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsins-dependent invasiveness of breast cancer cells through the regulation of the sodium-proton exchanger NHE1. Janvier 2011 Département de physiologie, université de Bari, Bari, Italie

BRISSON L., GILLET L., LE GUENNEC J-Y., BESSON P., GORE J. & ROGER S. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsins-dependent invasiveness of breast cancer cells through the regulation of the sodium-proton exchanger NHE1. Septembre 2010 - First Symposium of the International Society for Proton Dynamics in Cancer. Rome, Italie

BRISSON L., GILLET L., LE GUENNEC J-Y., BESSON P., GORE J. & ROGER S. Le canal sodique $Na_V1.5$ stimule l'invasion des cellules cancéreuses mammaires via l'échangeur sodium-proton NHE1. Juin 2010 - Forum de l'école doctorale Santé, Sciences, Technologies- Université de Tours

Communications affichées

BRISSON L., ANTELMI E., GILLET L., BESSON P., GORE J., RESHKIN SJ. & ROGER S NaV1.5 sodium channels promote MDA-MB-231 human breast cancer cells invasiveness by increasing NHE1 activity in invadopodia. Ion Transport and Cancer International Meeting-Würzburg, Allemagne (2012)

BRISSON L., GILLET L., ANTELMI E., BESSON P., CALAGHAN S., RESHKIN S.J., GORE J. & ROGER S. $Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H+ efflux in caveolin-rich microdomains. Ion Channel Signaling Mechanisms: From Basic Science to Clinical Application- Marrakesh, Maroc (2011)

BRISSON L., ANTELMI E., GILLET L., BESSON P., GORE J., RESHKIN SJ., & ROGER S. $Na_V1.5$ sodium channels promote MDA-MB-231 human breast cancer cells invasiveness by increasing NHE1 activity in invadopodia. 2nd ISPDC Meeting-Nice, France (2011)

BRISSON L., GILLET L., LE GUENNEC J-Y., BESSON P., GORE J. & ROGER S. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsins-dependent invasiveness of breast cancer cells through the regulation of the sodium-proton exchanger NHE1. 5èmes Journées du Cancéropole grand ouest-Tours, France (2010)

BRISSON L., GILLET L., CALAGHAN S., LE GUENNEC J-Y., BESSON P., GORE J. & ROGER S. $Na_V1.5$ regulates the activity of the sodium-proton exchanger NHE1 and enhances human breast cancer cells invasiveness. 20th Ion Channel Meeting-Presqu'île de Giens, France (2009)

Prix et récompenses

Boursière L'Oréal France-Académie des sciences-Unesco Pour les femmes et la science 2011

Prix du poster 2nd ISPDC Meeting-Nice, France 2011

Prix du jeune chercheur du comité Touraine de la Fondation pour la Recherche Médicale 2011

Liste des tableaux

Tableau I : Inhibition des échangeurs sodium-proton situés au niveau de la membrane plasmique par des inhibiteurs pharmacologiques (IC50 ou Ki en µM). 76
Tableau II : Composition du DPBS..... 136
Tableau III : Composition de la solution de trypsine-EDTA 137
Tableau IV : Composition du Matrigel™ 138
Tableau V : Amorces utilisées pour la PCR..... 145
Tableau VI : Composition du tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS pH 8,3 152
Tableau VII : Composition du tampon de transfert pH 8,3..... 152
Tableau VIII : Composition du TTBS pH 7,4..... 153
Tableau IX : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blotting 154
Tableau X : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le western blotting..... 155
Tableau XI : Composition des solutions utilisées pour les mesures de pH intracellulaire. ... 166
Tableau XII : Composition de la solution hyperpotassique. 171
Tableau XIII : Composition des solutions utilisées pour les mesures d'entrée de lithium par l'échangeur sodium-proton. 174
Tableau XIV : Composition de la solution physiologique saline (PSS) et du milieu intrapipette (MIP). 177
Tableau XV : Composition des solutions de saccharose utilisées pour former le gradient de densité..... 182
Tableau XVI : Composition des tampons de lyse. 184
Tableau XVII : Liste des différents anticorps primaires et secondaires utilisés pour la microscopie de fluorescence. 187

Liste des figures

Figure 1 : Incidence du cancer du sein dans le monde. 30
Figure 2 : Schéma illustrant les étapes de la cancérisation. 37
Figure 3 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses. 38
Figure 4 : Illustration des différentes étapes aboutissant à la formation des métastases. 44
Figure 5 : Modèle de symbiose entre cellules cancéreuses glycolytiques et oxydatives. 59
Figure 6 : Gradient de pH extracellulaire dans les tumeurs. 64
Figure 7 : Régulateurs du pH dans les cellules cancéreuses. 70
Figure 8 : Modèle de la structure et des sites de régulation de NHE1. 72
Figure 9 : Nouveau modèle et fonctionnement de NHE1. 73
Figure 10 : Fonctionnement de l'échangeur sodium-proton NHE1. 74
Figure 11 : Structure et fonctionnement de la V-ATPase 86
Figure 12 : Structure des canaux sodiques dépendants du voltage. 112
Figure 13 : Structure tridimensionnelle du canal sodique dépendant du voltage Na_VAb. 113
Figure 14 : Structure du pore et du filtre de sélectivité du canal sodique dépendant du voltage bactérien Na_VAb. 114
Figure 15 : Modèles du mécanisme du mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation. 115
Figure 16 : Modèle du mécanisme d'inactivation rapide des canaux sodiques dépendants du voltage. 117
Figure 17 : Régulation des canaux sodiques dépendants du voltage. 120
Figure 18 : Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux sodiques dépendants du voltage présents dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. 129
Figure 19 : Principe de la réaction de polymérisation en chaîne. 143
Figure 20 : Courbes d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel. 147
Figure 21 : Inserts utilisés lors des tests de migration (A) et d'invasivité (B) cellulaire. 161
Figure 22 : Principe des mesures de pH intracellulaire avec le BCECF. 164
Figure 23 : Cinétique de mesure du pH intracellulaire à l'équilibre et du pouvoir tampon... 167
Figure 24 : Cinétique de mesure de l'activité de l'échangeur sodium-proton sur des cellules acidifiées par un pré-pulse d'ammonium. 168

Figure 25 : Structure de la molécule de DHPE. 170
Figure 26 : Protocole utilisé pour les mesures d'influx de lithium intracellulaire 173
Figure 27 : Fractionnement cellulaire et enrichissement des invadopodes. 183
Figure 28 : Expression transcriptionnelle de plusieurs régulateurs du pH dans des lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses ou non cancéreuses. 195
Figure 29 : Efficacité du siRNA dirigé contre NHE1 et toxicité de l'EIPA. 197
Figure 30 : Effet de l'inhibition de l'expression de NHE1 par un siRNA spécifique (siNHE1) sur la viabilité cellulaire et l'apoptose..... 198
Figure 31 : Rôle de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans la migration cellulaire. 199
Figure 32 : Schéma proposé de la régulation de NHE1 par $Na_V1.5$ dans les domaines membranaires riches en cavéoline-1 dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 210
Figure 33 : Régulation du pH des cellules cancéreuses mammaires invasives MDA-MB-435s. 212
Figure 34 : Régulation du pH périmembranaire des cellules MDA-MB-231 par NHE1. 214
Figure 35 : Effet des siRNA dirigés contre $Na_V1.5$ sur l'expression de NHE1 et contre NHE1 sur l'expression des cathepsines B et S. 216
Figure 36 : Schéma hypothétique d'une voie de signalisation impliquant la PKA et p38MAPK 218
Figure 37 : Régulation de NHE1 par la PKA et p38 MAPK. 219
Figure 38 : Effet de la TTX sur la phosphorylation de p38. 220
Figure 39 : Activation de la phosphorylation de ERK1/2 par l'inhibition du canal $Na_V1.5$.. 220
Figure 40 : Comparaison de la forme et de la distribution de $Na_V1.5$, de MT1-MMP et de l'actine en présence ou non d'une matrice extracellulaire. 225
Figure 41 : Caractérisation des invadopodes des cellules MDA-MB-231. 227
Figure 42 : Localisation de la cavéoline-1 dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231. 228
Figure 43 : Localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans des zones riches en actine et dégradation la matrice extracellulaire. 229
Figure 44 : Schéma hypothétique de la régulation de NHE1 par $Na_V1.5$ dans les invadopodes des cellules cancéreuses MDA-MB-231. 251
Figure 45 : Rôle de la polymérisation de l'actine dans l'effet du canal $Na_V1.5$ sur l'activité de NHE1. 257
Figure 46 : Identification de complexes protéiques par électrophorèse en condition non dénaturante. n=2 258

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

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

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Bovine Serum Albumin, albumin sérique bovine

Ct : Threshold Cycle, cycle seuil

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

DIDS : acide 4,4’-diisothiocyanatostilbene-2,2’-disulfonique

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

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_V : Canaux sodiques dépendants du voltage

NHE : Echangeur sodium-proton

NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide

PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne

pH : potentiel hydrogène

pH_e : pH extracellulaire

pH_i : pH intracellulaire

pH_m : pH membranaire

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine kinase C

PSS : Physiological Saline Solution

ROS : Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

shRNA : small hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SVF : Sérum de Veau Fœtal

V-ATPase : pompe à protons de type vacuolaire

TTX : Tétrodotoxine

Introduction

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent (23 % des cancers) et représente la première cause de mortalité par cancer dans la population féminine mondiale. En France en 2011, on estime à près de 53 000 nouveaux cas de cancer du sein détectés et plus de 11 500 décès liés à ce cancer. L'incidence du cancer du sein est en augmentation constante depuis 1980 (Belot *et al.*, 2008), ceci probablement due à la systématisation des campagnes de dépistage. Malgré une mortalité en recul sur la période 1980-2005, celle-ci reste encore élevée. La forte mortalité associée à ce cancer résulte principalement du développement de métastases qui fait intervenir différents phénomènes moléculaires et cellulaires permettant aux cellules cancéreuses de s'échapper de la tumeur primaire afin d'envahir de nouveaux tissus. Ce phénomène d'envahissement tumoral est lié aux propriétés de migration des cellules cancéreuses ainsi qu'à leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire. Parmi les différentes étapes aboutissant à la formation des métastases, la dégradation de la matrice extracellulaire lors de l'invasion semble être une étape clé. L'invasivité cellulaire est un phénomène finement régulé faisant intervenir d'une part un remodelage dynamique du cytosquelette et d'autre part l'expression et l'activation de protéases responsables de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Des facteurs du microenvironnement tumoral, tels que le pH, jouent un rôle important dans l'invasivité des cellules cancéreuses. Depuis peu, des structures cellulaires spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses ont été mises en évidence : les invadopodes, équivalents fonctionnels des podosomes des cellules non cancéreuses. Ces structures, par le recrutement et la sécrétion de protéases, permettent une dégradation focalisée de la matrice extracellulaire. La connaissance des structures et mécanismes impliqués dans l'invasivité des cellules cancéreuses est essentielle pour tenter de réduire la forte mortalité associée au développement des métastases.

Il est admis depuis une vingtaine d'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. Bien que clairement établi, le rôle des canaux ioniques dans les propriétés des cellules cancéreuses n'est pas entièrement compris ce qui en fait un champ d'étude prometteur dans le domaine du cancer.

L'unité Inserm U1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », s'attache à comprendre le rôle des canaux ioniques exprimés dans les cellules cancéreuses et les mécanismes qui les lient aux propriétés de migration ou d'invasivité cellulaire. Le laboratoire a été l'un des premiers à démontrer l'expression de canaux sodiques dépendants du voltage dans des cellules

cancéreuses. Il a été démontré que l'isoforme $Na_V1.5$, classiquement décrite comme étant une isoforme cardiaque, est exprimée et fonctionnelle dans les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231, tandis qu'elle est absente des cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives ou non cancéreuses (Roger *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'expression de canaux sodiques est retrouvée sur des biopsies de tissus cancéreux mammaires et est corrélée à l'envahissement ganglionnaire. L'expression de canaux sodiques dépendants du voltage a donc été proposée comme marqueur de métastases (Fraser *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012).

L'activité de ce canal sodique dépendant du voltage, $Na_V1.5$, est responsable d'une entrée continue de sodium dans les cellules MDA-MB-231 due à un courant de fenêtre. Cette entrée de sodium par le canal $Na_V1.5$ n'est pas impliquée dans la prolifération ni dans la migration des cellules cancéreuses mammaires mais participe à l'invasion de la matrice extracellulaire par ces cellules (Roger *et al.*, 2003). L'inhibition de l'activité de ce canal par un inhibiteur spécifique (tétrodotoxine) conduit à une diminution du nombre de cellules traversant un filtre recouvert de Matrigel™, à une diminution de la taille de colonies cellulaires formées en trois dimensions et à une réduction du nombre de cellules s'échappant de ces colonies (Gillet *et al.*, 2009). La fonctionnalité des canaux $Na_V1.5$ dans les cellules cancéreuses mammaires de la lignée MDA-MB-231 augmente leur invasivité par l'intermédiaire d'une acidification extracellulaire, responsable d'une potentialisation de l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine B et S sécrétées dans le milieu extracellulaire (Gillet *et al.*, 2009).

Le pH cellulaire étant un paramètre physiologique finement régulé, il fait intervenir de nombreuses protéines membranaires. L'objectif de cette thèse était d'identifier les acteurs de la régulation du pH des cellules MDA-MB-231, de faire le lien avec l'invasivité de ces cellules cancéreuses et de déterminer ceux dont l'activité est modulée par le canal $Na_V1.5$.

Les résultats obtenus permettent une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires et pourraient aboutir à la proposition de nouveaux marqueurs pronostiques ou éventuellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Première partie

Revue bibliographique

I. Biologie de la cellule cancéreuse : le cancer du sein

A. Généralités sur le cancer

Le cancer est responsable de nombreux décès et représente un problème majeur de santé publique. Les mécanismes du développement local des cancers et du processus métastatique n'étant pas entièrement élucidés, la poursuite des recherches permettant une meilleure compréhension de la biologie de la cellule cancéreuse est un enjeu essentiel pour la prévention et le développement de traitements efficaces.

Une tumeur (ou néoplasie) désigne un tissu néo-formé due à une prolifération cellulaire accrue et anormale. Certaines tumeurs sont bénignes d'autres peuvent être malignes et sont alors nommées cancers. L'acquisition des propriétés rendant la prolifération cellulaire excessive est le résultat d'un ensemble de mutations génomiques induites par des agents physico-chimiques ou des virus et peut être liée à des facteurs de prédisposition génétique. Lorsque la tumeur est cancéreuse, elle est capable de croître et de s'étendre en disséminant dans l'organisme de nouvelles tumeurs malignes (métastases). Certaines de ces cellules cancéreuses peuvent en effet acquérir des propriétés de migration et d'invasivité leur permettant d'atteindre la circulation sanguine ou lymphatique puis de s'implanter et de développer une tumeur secondaire dans un nouveau tissu. Une tumeur cancéreuse n'est pas seulement composée de cellules cancéreuses mais également d'un stroma ne présentant pas d'anomalies génétiques qui communique avec la tumeur. Ce stroma participe au développement de la tumeur par la formation de vaisseaux qui alimentent la tumeur (angiogenèse tumorale) mais aussi par l'action de certaines cellules immunitaires. L'organisme porteur du cancer est mis en danger par l'envahissement de différents organes par les tumeurs primaires et secondaires empêchant leur fonctionnement. Ce phénomène de dissémination métastatique est la majeure cause de décès par cancer, il représente donc une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies.

1. Etymologie et historique

Le cancer, n'est pas une maladie récente et existe probablement depuis les origines de la vie. Le terme « cancer » provenant du grec « Karkinos » est apparu au 4ème siècle avant J-C grâce à Hippocrate (460-377 av. J-C) qui en fit les premières descriptions. Le terme « Karkinos » signifiant crabe a été utilisé du fait de la forme des grosseurs malignes observées et a été traduit en latin par Celsus (28 av. J-C-50 ap. J-C) par le mot « cancer ». L'analogie avec le crabe vient également du fait que les crabes avec leurs pinces ne lâchent pas leur proie tout comme les cancers. Jusqu'au 18ème siècle, le cancer est considéré comme une maladie générale de l'organisme entier dont les traitements étaient basés sur la théorie des humeurs développée par Galien (131-201 ap. J-C). Avec les avancées scientifiques du 18ème et 19ème siècle, le cancer est mieux décrit et devient une pathologie locale qui peut se généraliser. La notion de métastases apparaît alors pour définir les tumeurs qui se forment à distance de la tumeur initiale.

Le terme cancer regroupe un ensemble de pathologies différentes dénommées en fonction de l'origine du tissu atteint : les sarcomes pour les tissus conjonctifs, les carcinomes pour les tissus épithéliaux, les blastomes pour les tissus embryonnaires, les cancers hématopoïétiques (lymphomes et leucémies), les mélanomes pour le tissu mélanique, les cancers du tissu nerveux, et les cancers du tissu germinal.

2. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer fait partie des principales causes de mortalité dans le monde en représentant environ 13% de la mortalité mondiale avec 7,6 millions de décès et 12,7 millions de nouveaux cas en 2008. L'étude GLOBOCAN 2008 (Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008) a permis l'établissement de statistiques mondiales concernant l'incidence et la mortalité par cancer dans le monde (Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011). Les cancers du sein, de la prostate, du poumon, du colon et de l'estomac sont les cinq cancers les plus fréquents dans le monde. Le risque d'avoir un cancer avant l'âge de 75 ans dans la population mondiale est de 18,6 % et celui de mourir d'un cancer avant l'âge de 75 ans est de 11,1 %. Cette étude permet également de mettre en évidence une différence entre pays développés et pays en cours de développement selon les cancers. D'une manière générale dans le monde, tous types de cancers confondus, l'incidence

et la mortalité sont plus importantes dans les pays les plus développés même si cela varie selon les cancers.

D'après le rapport 2011 « la situation du cancer en France » de l'Institut National du Cancer dans le cadre du plan cancer 2009-2013, 365 500 nouveaux cas de cancers et 147 500 décès par cancer ont été estimés en 2011 en France. Le cancer est devenu la première cause de mortalité chez l'homme avec environ 33 % des décès (depuis 1988) et la deuxième chez la femme avec 24 % des décès pour la période 2004-2008. Il existe une variation géographique pour le taux d'incidence de cancer : on observe un gradient nord-sud, avec une incidence plus élevée dans le nord que dans le sud, cette variation étant plus importante pour les hommes que pour les femmes. Les cancers les plus mortels en France en 2011 sont le cancer du poumon, les cancers colorectaux, le cancer du sein et le cancer de la prostate. D'une manière générale, l'incidence des cancers augmente alors que la mortalité par cancer diminue. Ceci peut s'expliquer par la mise en place de diagnostics précoces qui permettent de détecter un plus grand nombre de cancers et par une meilleure efficacité des traitements. Il est à noter que même si cette variation de l'incidence et de la mortalité est observée pour un grand nombre de cancers, les cancers de mauvais pronostics ont tendance à avoir une incidence et une mortalité en recul.

3. Facteurs de risque

La formation d'un cancer résulte d'anomalies génétiques acquises par des facteurs carcinogènes ou hérités. La première mise en évidence d'un lien entre une substance et l'apparition des cancers a été faite à la fin du 18ème siècle avec la relation faite entre le travail des ramoneurs et le cancer du scrotum dû à la suie et aux goudrons qui imprégnaient leurs vêtements. Cette notion de cancer professionnel a permis d'identifier un grand nombre de substances facteurs de risque cancérigènes. Parmi les cancers professionnels, ceux liés à l'exposition à l'amiante, l'arsenic, le benzène, le cadmium et le formaldéhyde sont les plus connus.

Les facteurs de risque peuvent être classés en facteurs endogènes et exogènes. Parmi les facteurs endogènes, l'âge prend une place importante, avec une augmentation de l'incidence et de la mortalité par cancer avec l'âge. Ce phénomène peut être expliqué par une moins bonne efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN lors du vieillissement et par la durée

d'exposition aux substances carcinogènes. Des facteurs génétiques familiaux peuvent également être impliqués dans certains types de cancers tels que les cancers colorectaux et les cancers du sein et de l'ovaire. De nombreux facteurs de risques exogènes ont été identifiés. Ils sont présents dans l'environnement (agents chimiques, agents ionisants, virus) ou sont le résultat de facteurs de l'alimentation ou comportementaux (tabac, alcool). Les efforts de prévention visent à diminuer le contact avec ces agents et à réduire les facteurs comportementaux. La base de données des monographies sur les risques de cancérogénicité pour l'homme du Centre International de Recherche sur le Cancer de l'Organisation Mondiale de la Santé tente de répertorier les agents identifiés comme augmentant le risque de cancer. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 30 % des décès par cancer sont dus à cinq facteurs de risque principaux : un indice de masse corporelle élevé, une faible consommation de fruits et légumes, un manque d'exercice physique, la consommation de tabac et d'alcool. Le tabac reste le facteur de risque le plus important en représentant 22 % de la mortalité par cancer et 71 % des décès par cancer du poumon.

4. Diagnostic et traitements

Les différentes méthodes de diagnostic utilisées ont pour but d'identifier la présence ou non d'une tumeur, de déterminer son caractère bénin ou malin, de classifier la tumeur et de pronostiquer son évolution potentielle et sa réponse aux traitements.

Plusieurs outils diagnostiques sont utilisés comme des études anatomo-pathologiques et des études d'anomalies génétiques. Les études anatomo-pathologiques sont basées sur l'étude de la morphologie des cellules ou du tissu et peuvent utiliser l'immunocyto- ou histo-chimie. En effet, une tumeur maligne est mal délimitée, non encapsulée, peu différenciée, les cellules sont irrégulières et les tissus adjacents peuvent être envahis. L'utilisation de différentes colorations et marquages immunologiques permet de diagnostiquer et d'émettre une valeur pronostique sur une tumeur. L'expression de marqueurs tumoraux ou de récepteurs peut être recherchée pour préciser le diagnostic. Des outils de biologie moléculaire sont également utilisés pour évaluer les anomalies génétiques de la tumeur dans un but de diagnostic ou de pronostic.

Le diagnostic d'une tumeur aboutit à sa classification en grade et en stade afin de déterminer le pronostic de réponse aux traitements et son évolution. Le grade permet d'évaluer le degré

de différenciation d'une tumeur alors que le stade permet de déterminer son degré d'extension. Le système TNM est le plus couramment utilisé. Il est basé sur l'attribution d'un chiffre entre 0 et 4 pour la taille de la tumeur et son extension (T), pour la dissémination aux ganglions lymphatiques (N) et pour la présence ou l'absence de métastase (M).

Le diagnostic d'un cancer est un élément clé dans la mise en place du traitement et dans l'efficacité de celui-ci. Plus le cancer est diagnostiqué tôt plus les chances de survie sont élevées. Le choix du traitement mis en place sera déterminé à partir des valeurs diagnostiques et pronostiques. Le traitement doit être le plus efficace possible, sans effets secondaires trop importants et ne présentant pas un coût trop élevé. Les principaux traitements utilisés sont :

- la chirurgie afin de retirer en totalité la tumeur,
- la radiothérapie qui permet grâce à l'action de radiations ionisantes la mort des cellules ciblées par des effets biologiques sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides,
- ou les chimiothérapies qui ont pour cibles principales les cellules en prolifération en bloquant leur division et dont l'efficacité est limitée par l'accès de la circulation sanguine à la tumeur et le développement de résistances par les cellules cancéreuses.

L'évolution des méthodes de diagnostic et l'amélioration des traitements sont probablement à l'origine de l'augmentation du taux d'incidence des cancers et ont permis une augmentation sensible du taux de survie des patients. Mais l'amélioration des méthodes de détection et les campagnes de détection systématique des cancers posent un problème de surdépistage des tumeurs.

B. Le cancer du sein

1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde avec une estimation de 1,38 million de nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2008 ce qui représente 23 % des cancers féminins, et le deuxième cancer le plus fréquent pour les deux sexes avec 10,9 % des cancers (Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011). Il représente la

première cause de mortalité par cancer chez la femme dans le monde. Cependant même si le taux d'incidence a tendance à augmenter, la mortalité diminue dans le monde (Forouzanfar *et al.*, 2011). Des études épidémiologiques du cancer du sein dans le monde ont permis de mettre en évidence des disparités géographiques. Les plus faibles taux d'incidence sont observés en Asie et en Afrique et les plus forts en Europe de l'ouest et en Amérique du Nord (Figure 1) (Ferlay *et al.*, 2010; Forouzanfar *et al.*, 2011). Il existe également des disparités entre pays développés et pays en cours de développement avec un risque plus important pour les pays développés (Jemal *et al.*, 2011), l'exception étant le Japon.

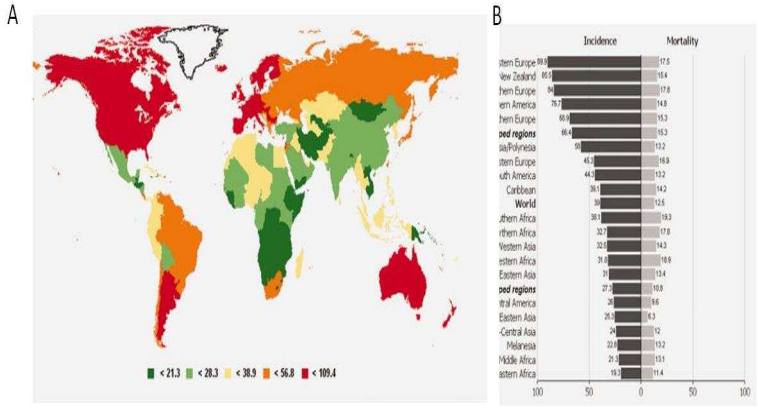


Figure 1 : Incidence du cancer du sein dans le monde.

Incidence du cancer du sein estimée en 2008 dans le monde par 100 000 habitants. Source : Ferlay *et al.*, 2010

En France, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, où il représente 33,4 % des nouveaux cancers diagnostiqués, et est la première cause de mortalité par cancer chez la femme (18,3 %) (« La situation du cancer en France en 2011 »). En 2011, on estime à près de 53 000 nouveaux cas de cancers du sein détectés et plus de 11 500 décès liés à ce cancer. Son incidence a augmenté de façon constante de 2,4 % par an pendant la période 1980-2005 (Belot *et al.*, 2008) alors que la mortalité par cancer du sein a diminué de 13 % entre 1994 et 2008 (Institut National du Cancer). Concernant l'évolution de l'incidence du cancer du sein, l'hypothèse retenue par le rapport 2011 « la situation du cancer en France » est une stabilisation de l'incidence entre 2005-2011, qui pourrait être liée à la diminution de la prescription des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. La mortalité devrait maintenir sa diminution sur la période 2005-2011. L'évolution du cancer du sein en France lors des 20 dernières années, avec une augmentation de l'incidence et une diminution de la

mortalité, pourrait être le reflet de l'amélioration des traitements ainsi que d'un diagnostic plus précoce lié au développement du dépistage.

2. Facteurs de risque

Les disparités géographiques de l'incidence du cancer du sein et l'exception du Japon pourraient s'expliquer par une différence culturelle de consommation alimentaire par rapport aux pays européens ou à l'Amérique du Nord. De plus, des études sur la migration des populations montrent que les migrants venant d'une région à faible incidence du cancer du sein vers une région à forte incidence acquièrent le taux d'incidence de la région d'accueil (Kaur, 2000; Tyczynski *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1993). Ces études ont permis de démontrer l'implication de facteurs environnementaux et nutritionnels comme facteurs de risque du cancer du sein. Le laboratoire Inserm U1069 « Nutrition Croissance et Cancer » s'intéresse plus particulièrement au rôle des acides gras polyinsaturés de la série n-3 dans le cancer du sein. Le laboratoire a mis en évidence un profil lipidique marqueur de la part nutritionnelle du risque de cancer du sein (Bougnoux *et al.*, 2008). Il a également été démontré que la supplémentation en un acide gras polyinsaturé de la série n-3, l'acide docosahexaènoique (DHA,22 :6 n-3), augmente la survie de patientes traitées par chimiothérapie pour des cancers du sein métastasés (Bougnoux *et al.*, 2009; Bougnoux *et al.*, 2010). De même, l'obésité est associée à une augmentation d'environ 50 % du risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées (Key *et al.*, 2001; Wenten *et al.*, 2002).

Des facteurs hormonaux sont également impliqués dans le risque de survenue d'un cancer du sein. Sont associés à une augmentation du risque de cancer du sein : un âge précoce des premières menstruations, une ménopause tardive, l'utilisation de contraceptifs oraux et les traitements hormonaux substitutifs à la ménopause. En revanche les femmes multipares et ayant allaité ont un risque de survenue de cancer du sein diminué (Key *et al.*, 2001). L'augmentation du risque de cancer du sein par l'obésité est probablement liée à un effet hormonal par augmentation de l'œstradiol ou à l'inflammation.

L'implication de facteurs génétiques dans le cancer du sein a été mise en évidence par l'observation d'un risque plus élevé de cancer du sein chez une femme lorsque sa mère ou sa sœur a développé un cancer du sein. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont les plus impliqués dans les facteurs héréditaires du cancer du sein. Ces gènes codent pour des protéines de réparation

de l'ADN (breast cancer susceptibility protein). Des mutations dans ces gènes sont connues pour augmenter le risque de cancer du sein et de l'ovaire. Une femme porteuse d'une mutation sur *BRCA1* ou *BRCA2* possède un risque de 84 % de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans, ce risque est de 6 % pour les hommes (Ford *et al.*, 1998; Wolpert *et al.*, 2000). Ces mutations sont retrouvées dans 2 à 10 % des cancers du sein (Peto *et al.*, 1999). Elles induisent une instabilité génomique due à une mauvaise réparation de l'ADN qui associée à un patrimoine génétique commun et des habitudes de vie identiques permettent d'expliquer le taux de cancer du sein chez les familles porteuses de mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*.

3. Le tissu mammaire normal et cancéreux

Le tissu mammaire est composé de glandes mammaires sécrétrices de lait en période de lactation, de tissu adipeux et d'un tissu conjonctif. La glande mammaire est constituée de lobes et lobules séparés par du tissu conjonctif. Les alvéoles des lobules constituent la partie sécrétrice de la glande et sont drainées vers le mamelon par un réseau de canaux galactophores. La glande mammaire est entourée de tissu adipeux, d'un tissu conjonctif de soutien composé de fibroblastes et d'un réseau de collagène, de laminine et de glycosaminoglycanes. Des vaisseaux sanguins et lymphatiques sont également présents à proximité de la glande mammaire. Un réseau de canaux galactophores est présent chez les deux sexes mais ne se développe que chez les femmes lors de la puberté sous l'influence des hormones sexuelles.

La glande mammaire est une structure qui évolue fortement au cours de la vie. Lors de la puberté, les œstrogènes et la progestérone augmentent la prolifération et la division dichotomique des canaux galactophores et forment des alvéoles primaires non matures. En dehors des périodes de gestation et d'allaitement, la glande mammaire n'a pas d'activité sécrétrice mais varie au cours de chaque cycle menstruel selon les concentrations en œstrogènes et progestérone. Pendant la grossesse le nombre et la taille des alvéoles sont augmentés puis la fonction sécrétrice de la glande mammaire s'active durant l'allaitement. Lors de la ménopause, les structures canalaires et alvéolaires involuent. La glande mammaire, du fait de son évolution constante, est composée de cellules possédant une grande activité de prolifération et de différenciation. Ces propriétés font de la glande mammaire une structure

sensible au processus de cancérisation. La présence de canaux galactophores primitifs chez les hommes les rend également susceptibles au cancer du sein, ils représentent environ 1 % des cancers du sein (Jemal *et al.*, 2011).

Il existe deux grands types de cancer du sein : le carcinome *in situ* ou le carcinome infiltrant pouvant être situés au niveau des canaux galactophores (carcinome intracanalaire) ou dans les alvéoles (carcinome intralobulaire). Le carcinome *in situ* se définit comme une prolifération épithéliale maligne qui n'envahit pas le tissu mammaire, la membrane basale entre les lobules est préservée contrairement au carcinome infiltrant. Le carcinome infiltrant évolue d'abord en infiltrant le tissu mammaire puis peut former des métastases par dissémination ganglionnaire. Le carcinome intracanalaire est le plus fréquent et représente environ 75 % des cancers du sein.

Les campagnes de dépistage en France ont permis un diagnostic plus précoce des cancers du sein. Le diagnostic du cancer du sein est généralement effectué par une mammographie puis par analyse anatomo-pathologique d'une biopsie. La détection par immuno-histochimie des récepteurs hormonaux, récepteurs nucléaires aux œstrogènes de type ER et récepteurs nucléaires à la progestérone, détermine l'hormono-dépendance du cancer. Cette analyse permet donc de prédire la réponse d'un cancer à une hormonothérapie. La surexpression dans 20 à 30 % des cancers du sein de l'oncogène codant pour la protéine HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor-2**)** est également utilisée pour prédire la réponse thérapeutique. Un anticorps monoclonal, le trastuzumab (Herceptin®, Roche), ayant obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en indication pour les cancers du sein métastatiques et en situation adjuvante, cible la protéine HER2.

Actuellement, il existe une classification moléculaire des cancers du sein en fonction de l'expression des récepteurs hormonaux et de HER2. Cette classification a permis de séparer les cancers du sein en quatre groupes majeurs : luminal A, luminal B, HER2 et triple négatif (Perou *et al.*, 2000; Weigelt *et al.*, 2008). Les cancers de type luminal sont les formes les plus fréquentes de cancers du sein (80 %) et regroupent les cancers du sein exprimant des récepteurs aux œstrogènes (et peuvent également exprimer HER2). Ce groupe est séparé en deux sous-groupes selon l'expression de ces récepteurs : luminal A pour une expression forte et luminal B pour une expression plus faible des récepteurs aux œstrogènes. Parmi les cancers du sein n'exprimant pas de récepteurs aux œstrogènes (environ 20 % des cancers du sein), un groupe est constitué de cancers surexprimant la protéine HER2. Le dernier groupe des cancers

« triples négatifs » (ou basal-like) n'exprime ni les récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone, ni HER2 et constitue donc un groupe de cancers de mauvais pronostic puisque insensibles à l'hormonothérapie et au trastuzumab. Ces cancers, retrouvés surtout chez les femmes jeunes, sont très agressifs et présentent un taux de métastases élevé. Les cancers de type luminal A sont de bon pronostic alors que les trois autres groupes sont de moins bon pronostic (Sorlie *et al.*, 2001). Cette classification moléculaire a permis de proposer deux voies de cancérogenèse mammaire, l'une aboutissant aux cancers n'exprimant pas de récepteurs aux œstrogènes et l'autre exprimant ces récepteurs (Sgroi, 2010).

Les thérapies utilisées pour un cancer du sein sont en fonction des données biologiques et pronostiques la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'hormonothérapie (pour les cancers possédant des récepteurs hormonaux). L'hormonothérapie réduit la prolifération cellulaire en s'opposant à l'action stimulante des hormones. Des anti-aromatases peuvent être utilisées pour empêcher la synthèse d'œstrogènes à partir des androgènes. Ces anti-aromatases ont démontré un effet bénéfique sur la mortalité par cancer du sein (Group, 2005) (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Certains de ces traitements peuvent être utilisés simultanément. Selon les données du SERR (Surveillance Epidemiology and End Results), les patientes présentant une tumeur localisée ont un taux de survie à cinq ans de 98 %. Le taux de survie diminue à 84 % pour un stade régional et chute à 24 % en présence de métastases. Les métastases sont en effet responsables de la plupart des décès par cancer du sein. C'est pourquoi il est essentiel de mieux comprendre les phénomènes conduisant à la formation des métastases et de pouvoir établir des cibles pronostiques ou thérapeutiques.

C. Histoire naturelle du cancer

Il existe au sein de l'organisme, une homéostasie très finement régulée entre prolifération et mort cellulaire. Le développement d'un cancer peut se définir comme une altération de cette homéostasie aboutissant à une prolifération cellulaire dérégulée. Loin du concept que la mutation d'un seul gène est responsable d'une pathologie, dans le cas des cancers, une multitude de gènes sont en cause et l'environnement peut également être impliqué. Un cancer se développe généralement en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression au cours desquelles la cellule cancéreuse acquière des modifications lui permettant de survivre et de proliférer de manière anarchique (Farber, 1984; Harris, 1991; Jakobisiak *et al.*, 2003). Le

temps qui s'écoule entre ces trois étapes peut être très long et la possibilité de passer d'une étape à une autre est extrêmement faible et est le résultat non pas d'une seule mutation mais de plusieurs. Les carcinomes, cancer des tissus épithéliaux, seront utilisés comme exemple pour décrire les différentes étapes du développement d'une tumeur puisqu'ils sont les seuls à pouvoir évoluer de l'étape de cancer *in situ* à celle de cancer invasif en raison de leur séparation du tissu conjonctif par une lame basale. La plupart des cancers non épithéliaux sont invasifs d'emblée puisqu'il n'y a pas de lame basale à franchir.

1. Les trois étapes de la formation d'un cancer

a) Initiation

Lors de l'étape d'initiation, des altérations de l'ADN apparaissent dans les cellules sous l'influence de carcinogènes et aboutissent à la formation de mutations. Des carcinogènes chimiques, physiques ou viraux sont présents partout dans l'environnement y compris dans l'alimentation et peuvent donner naissance à des altérations génétiques qui sont le plus souvent réparées par les systèmes de réparation de l'ADN. Certains agents protecteurs d'altérations peuvent être présents dans l'environnement ou produits dans les cellules tels que les systèmes de détoxification (antioxydants, superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) qui permettent d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène produites et responsables en grande partie des altérations de l'ADN induites par les carcinogènes. L'accès du carcinogène à l'ADN est également un facteur limitant le risque de cancer, en effet des enzymes peuvent métaboliser le carcinogène ou des protéines membranaires peuvent l'expulser hors de la cellule. Lorsque le carcinogène parvient à l'ADN et que l'altération n'est pas éliminée par les systèmes de réparation de l'ADN présents dans les cellules, elle aboutit à la formation d'une mutation qui, lorsqu'elle est située dans certains gènes clés peut donner naissance à une tumeur.

Certain facteurs héréditaires peuvent favoriser l'initiation de la carcinogenèse. C'est le cas de l'altération du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (ou Nucleotide-excision repair NER) observée dans le xeroderma pigmentosum qui augmente significativement le risque de cancer (Kraemer *et al.*, 1987). *HER2*, c-*MYC* (codant pour un facteur de transcription) ou encore *RAS* (codants pour des petites GTPase) sont des proto-

oncogènes connus pour favoriser l'initiation des tumeurs. Les gènes suppresseurs de tumeur *BRCA1*, *BRCA2* et *TP53* sont impliqués dans de nombreux cancers.

b) Promotion

L'étape de promotion est caractérisée par l'expansion clonale d'une cellule initiée en présence d'un agent promoteur. Des mutations qui augmentent l'activité de proto-oncogènes ou diminuent celle de gènes suppresseurs de tumeur permettent de créer un avantage sélectif en faveur de la prolifération cellulaire soit en augmentant la prolifération soit en diminuant la mort cellulaire. Lors de cette étape de nouvelles mutations apparaissent et permettent la sélection de cellules pouvant proliférer en s'affranchissant des contraintes de l'environnement et ainsi aboutir à la formation d'une néoplasie qui n'est pas encore cancéreuse. Cette lésion peut régresser en absence de stimulation par l'agent promoteur. Il est proposé que l'environnement autour de la lésion (pauvre en oxygène et en nutriments du fait de l'absence de vascularisation) favorise la sélection de cellules capables de s'affranchir de ces conditions difficiles pour proliférer (Vincent and Gatenby, 2008). A la fin de l'étape d'initiation puis de promotion un déséquilibre homéostasique se crée en faveur d'une prolifération cellulaire accrue.

c) Progression

La transformation de la lésion néoplasique en cancer apparaît lors de la dernière étape de progression. De nouvelles modifications génétiques permettent aux cellules d'acquérir des propriétés de malignité. Le cancer *in situ* se développe et devient détectable à partir de 10^9 cellules. La tumeur envahit alors l'organe dans lequel elle est implantée perturbant son fonctionnement. Elle peut stimuler l'angiogenèse afin de lui apporter des éléments nutritifs par la circulation sanguine. Les cellules peuvent également mettre en place des moyens d'échappement aux systèmes qui normalement détectent et éliminent les cellules cancéreuses. L'acquisition des propriétés de migration et de dégradation de la matrice extracellulaire permet à certaines cellules de s'échapper de la tumeur primaire pour envahir de nouveaux tissus via la circulation. Le cancer devient invasif et des métastases peuvent alors se développer (Figure 2).

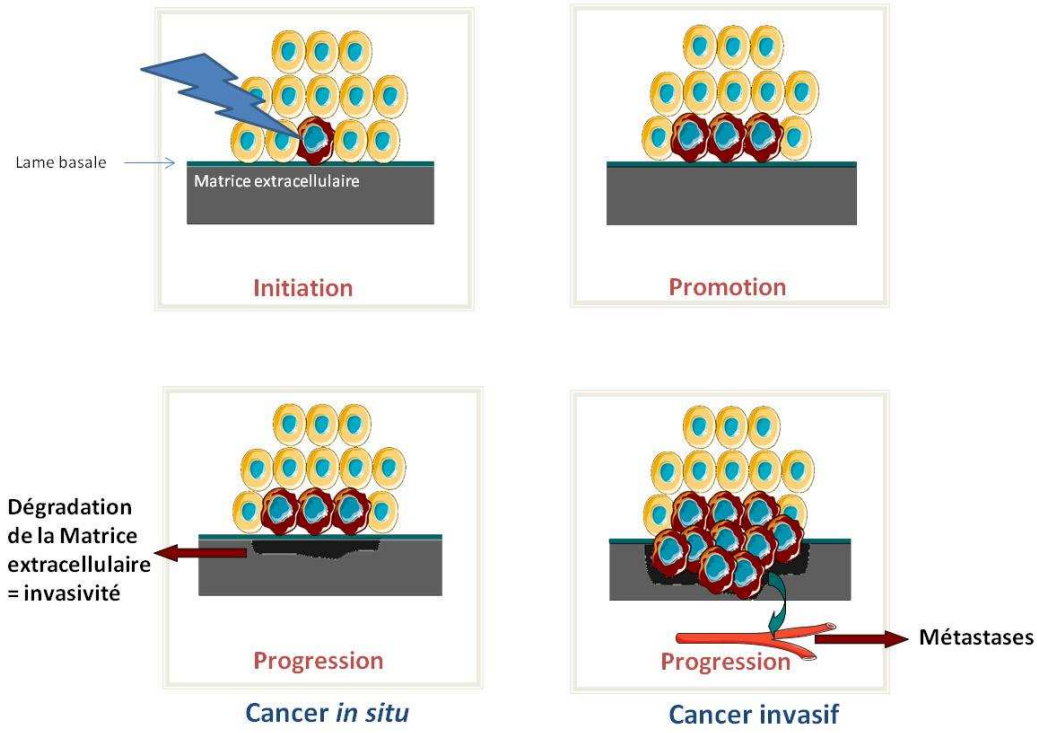


Figure 2 : Schéma illustrant les étapes de la cancérisation.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

2. Propriétés acquises par les cellules cancéreuses

Le phénomène de cancérisation est un phénomène complexe qui implique de nombreux changements génétiques. Ces modifications génétiques sont acquises progressivement aux cours des trois étapes de la cancérisation pour aboutir à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses hautement invasives. Chacune de ces modifications permet de créer un avantage sélectif et la progression de la cancérisation. Il a été proposé de simplifier ces phénomènes en regroupant les changements acquis par les cellules cancéreuses en dix grandes « signatures » (Hanahan and Weinberg, 2000). Ce modèle a permis de mettre en évidence huit caractéristiques des cellules cancéreuses : l'auto-suffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement à l'apoptose, une réplication illimitée, l'angiogenèse, l'invasion des tissus, le métabolisme et l'échappement du système immunitaire ainsi que deux facteurs favorisants l'acquisition de ces propriétés, l'instabilité génomique et le rôle du système immunitaire (Figure 3).

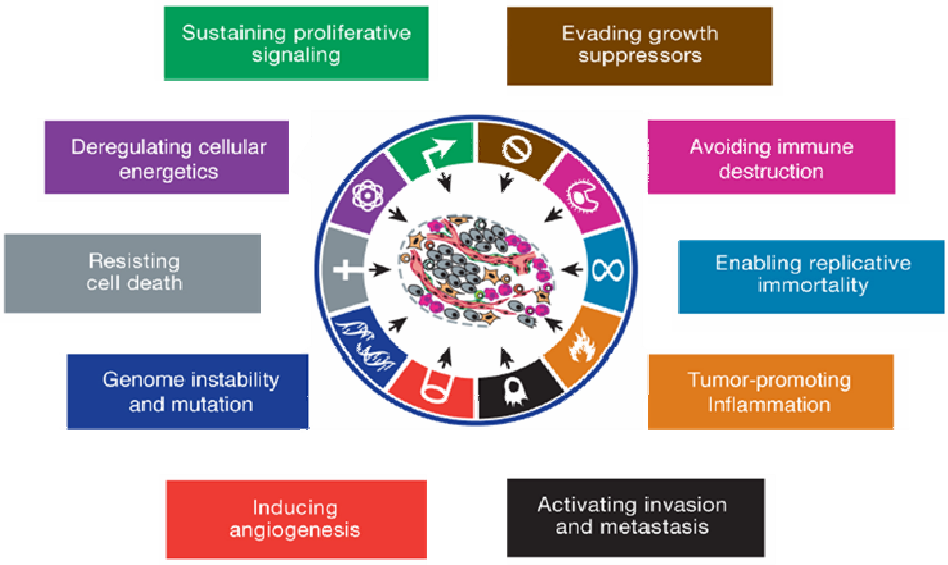


Figure 3 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses.

Modifié d'après Hanahan and Weinberg, 2011.

Les cellules normales ont besoin de signaux de croissance pour proliférer tels que des facteurs de croissance, des mitogènes, des cytokines, des composants de la matrice extracellulaire ou des cellules interagissant avec elles. En absence de signaux de croissance, les cellules normales restent quiescentes. Les cellules cancéreuses acquièrent une indépendance vis-à-vis de ces facteurs de croissance pour leur permettre de proliférer plus rapidement. Plusieurs stratégies peuvent être mises en place par la cellule cancéreuse : la production de facteurs de croissance pour elle-même aboutissant à la formation d'une boucle de stimulation autocrine, la surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance ou l'expression de récepteurs constitutionnellement actifs, l'expression d'intégrines favorisant la croissance cellulaire ou la stimulation de voies de signalisation de prolifération de manière indépendante de l'activation d'un récepteur par un ligand (oncogènes *RAS*). Le stroma qui entoure la tumeur peut également être détourné par les cellules cancéreuses pour favoriser leur croissance avec par exemple l'implication des cellules inflammatoires (Cordon-Cardo and Prives, 1999) ou la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules du stroma.

Les cellules peuvent également, toujours dans le but de croître au maximum, acquérir une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs. Une grande partie des tumeurs sont insensibles aux signaux anti-prolifératifs à cause d'une altération de la voie de la protéine du rétinoblastome qui normalement permet de bloquer le cycle cellulaire en phase G1. Le gène codant pour la

protéine du rétinoblastome est classé parmi les gènes suppresseurs de tumeur. Alors que la protéine du rétinoblastome transduit des signaux anti-prolifératifs extracellulaires, la protéine p53 peut ralentir la prolifération cellulaire à partir de signaux intracellulaires. Les cellules cancéreuses peuvent également favoriser des voies de prolifération cellulaire par une diminution de facteurs induisant la différenciation cellulaire ou par une altération du mécanisme d'inhibition de croissance lors de contacts cellulaires.

L'échappement des cellules cancéreuses au processus de mort cellulaire tels que l'apoptose ou l'autophagie est un autre élément essentiel de la cancérisation. Cette acquisition de l'insensibilité à la mort cellulaire peut s'effectuer par des altérations des systèmes de détection des anomalies ou dans le mécanisme propre de la mort cellulaire (pour l'apoptose : cytochrome c, caspases…). L'un des rôles de la protéine p53, dont le gène fait partie des gènes suppresseurs de tumeur, est d'augmenter l'expression de facteurs pro-apoptotiques en réponse à un dommage sur l'ADN (Junttila and Evan, 2009). Sa mutation retrouvée dans de nombreux cancers permet aux cellules de ne pas être entraînées vers les voies menant à l'apoptose. L'oncogène *BCL-2* codant pour une protéine ayant un rôle anti-apoptotique en empêchant le relargage du cytochrome c par les mitochondries est lui aussi impliqué dans le phénomène d'échappement à l'apoptose (Vaux *et al.*, 1988). Au contraire de l'apoptose et de l'autophagie, la mort cellulaire par nécrose peut avoir un effet bénéfique sur la croissance tumorale en libérant des composants cellulaires dans l'environnement extracellulaire permettant de recruter des cellules inflammatoires qui peuvent favoriser la croissance des tumeurs. Le phénomène de mort cellulaire en réponse à des signaux intracellulaires ou extracellulaires est un des moyens par lequel une pression de sélection s'effectue sur les cellules cancéreuses, les cellules résistantes pourront survivre alors que les autres seront éliminées.

L'augmentation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses n'est pas le seul élément nécessaire à la formation d'une tumeur. Les cellules cancéreuses doivent également aboutir au phénomène d'immortalisation sans lequel après un certain nombre de division les cellules seront touchées par le phénomène de sénescence puis de mort. Pour cela, les cellules cancéreuses doivent maintenir leurs télomères (Raynaud *et al.*, 2010). Une surexpression de la télomérase est observée dans de nombreux cancers.

Les cellules cancéreuses ont également besoin de l'oxygène et des nutriments apportés par la circulation sanguine. Les cellules cancéreuses, dès les premières étapes de la cancérogenèse

sont capables de réguler des signaux anti-angiogéniques et pro-angiogéniques pour induire la formation de nouveaux vaisseaux et alimenter la tumeur (Hanahan and Folkman, 1996). Certains oncogènes comme *RAS* ou *c-MYC* sont capables d'augmenter l'expression de facteurs pro-angiogéniques.

Lorsque les nutriments et la place sont limités, les cellules cancéreuses doivent posséder des mécanismes leur permettant d'envahir le tissu avoisinant puis de circuler par voie sanguine ou lymphatique pour coloniser de nouveaux tissus et former des métastases. Les modifications des interactions entre cellules par les protéines d'adhésion cellulaire (CAM pour Cell Adhesion Molecules) ou des interactions avec la matrice extracellulaire par les intégrines permettent aux cellules de se détacher de l'environnement tumoral. L'envahissement des tissus puis la formation de métastases nécessitent l'acquisition de propriétés d'invasivité qui permettent aux cellules cancéreuses de se déplacer et de dégrader la matrice extracellulaire (cf. paragraphe I.E Formation des métastases).

Récemment, ces six propriétés ont été complétées par deux nouvelles caractéristiques : le métabolisme des cellules cancéreuses et la capacité à éviter la destruction par le système immunitaire ainsi que deux nouvelles propriétés qui favorisent l'établissement des huit autres : l'instabilité génomique et l'importance de l'inflammation (Hanahan and Weinberg, 2011).

Parmi les deux nouvelles caractéristiques qui ont émergé au cours de ces dix dernières années, la description du métabolisme particulier des cellules tumorales, pourtant connu depuis longtemps, a ouvert de nouvelles pistes pour le traitement des cancers mais reste encore à étudier plus en détail. Les cellules cancéreuses utilisent majoritairement un métabolisme de glycolyse aérobie qui est favorable à la production des molécules nécessaires à la haute demande énergétique des cellules en prolifération (cf. paragraphe I.F Métabolisme des cellules cancéreuses). La dernière capacité acquise par les cellules cancéreuses est la possibilité d'échapper au système immunitaire. La démonstration d'une immunité anti-tumorale et des mécanismes de défense des cellules cancéreuses reste à clarifier.

Une grande partie des capacités décrites ci-dessus font intervenir des mutations génétiques, or la fréquence de mutation est relativement faible et de nombreux systèmes de réparations sont capables de corriger les erreurs. Les cellules cancéreuses ont acquis une instabilité génomique par des altérations dans un ou plusieurs systèmes de réparation de l'ADN ou dans les

systèmes de détection des anomalies permettant l'apparition de mutations. Tout comme l'instabilité génomique, le système immunitaire favorise le développement des tumeurs. Le système immunitaire possède un rôle paradoxal dans le développement des tumeurs. Il possède à la fois un rôle de défense anti-tumoral (comme la détection des agents infectieux par l'immunité innée) mais aussi une activité pro-tumorale (cf. paragraphe I.E.3.b Rôle du système immunitaire). Ce double rôle du système immunitaire dans le développement tumoral par des mécanismes d'immunité anti-tumorale ou par des mécanismes favorisants la progression tumorale est un nouveau champ à exploiter pour permettre de mieux comprendre les mécanismes de la croissance tumorale.

D. Histoire naturelle du cancer du sein

Deux théories s'affrontent pour décrire le développement du cancer du sein. La première théorie défendue par Halsted jusque dans les années 60 fait du cancer du sein une maladie locale avec une extension possible (Halsted, 1907). Elle est basée sur une description des différentes étapes du cancer du sein qui se produisent les unes après les autres. Une tumeur est formée par prolifération anarchique de cellules des canaux galactophores ou des cellules lobulaires. La tumeur évolue vers les ganglions puis des métastases se forment. Le traitement basé sur cette théorie était donc un traitement local par exérèse chirurgicale de la glande mammaire avec les muscles pectoraux et les ganglions axillaires, sus-claviculaires et mammaires internes. Selon l'hypothèse, cette chirurgie radicale et très mutilante permettait en retirant entièrement le sein de contrôler le développement du cancer.

Cette théorie est remise en question par l'observation de l'échec des chirurgies radicales indiquant que le cancer du sein n'est pas une maladie locale. Cette nouvelle théorie défendue par Fisher (Fisher *et al.*, 1985) fait du cancer du sein une maladie générale avec une dissémination précoce des métastases. Elle est supportée par l'observation d'un taux de survie identique entre une chirurgie radicale et une chirurgie de la masse tumorale associée à une radiothérapie. De plus il a été démontré que l'exérèse de la tumeur primaire augmente la croissance des cellules métastatiques résiduelles (Fisher *et al.*, 1983; Fisher *et al.*, 1989). A partir de ces observations, les chimiothérapies néo-adjuvantes (avant traitement chirurgical) ont été développées afin de réduire la taille de la tumeur et ainsi éviter une chirurgie trop mutilante.

Un cancer du sein se développe au niveau des cellules des canaux galactophores ou des lobules par des lésions précancéreuses qui conduisent à une hyperplasie simple puis plus importante. L'apparition d'anomalies cytologiques conduit à la formation d'un cancer *in situ* sans rupture de la membrane basale. Enfin le cancer *in situ* peut devenir invasif quand la rupture de la membrane basale permet le passage de cellules cancéreuses vers la circulation lymphatique ou sanguine et la formation de métastases. L'évolution du cancer du sein dans le temps est très variable. En général il se passe un temps très long entre les premières lésions précancéreuses et la formation du cancer *in situ* détectable cliniquement. La mise en évidence de métastases pour des cancers du sein à des stades peu avancés a permis de démontrer l'existence d'une dissémination précoce des cancers du sein. L'apparition des métastases est proportionnelle à la taille de la tumeur primaire bien que la dissémination métastatique puisse commencer avant que la tumeur ne soit détectable. Toute la difficulté de la prise en charge actuelle est de détecter suffisamment tôt le cancer du sein pour minimiser les risques de récidives métastatique. En effet une grande partie des récidives sont dues à des métastases, elles-mêmes responsables de la majorité des décès. Des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans le cancer du sein et pourraient être à l'origine de ces récidives (Al-Hajj *et al.*, 2003). Les sites de métastases les plus retrouvés dans le cancer du sein sont le foie, le poumon et l'os. Les divers groupes de cancers présentent des sites préférentiels de développement de métastases différents. Ainsi, les cancers du sein triples négatifs forment préférentiellement des métastases cérébrales et pulmonaires (Smid *et al.*, 2008).

E. Formation des métastases

Malgré une diminution générale de la mortalité par cancer depuis les années 1980 dans le monde, celle-ci reste très élevée et est le plus souvent une conséquence de la formation des métastases. Alors que la tumeur primaire peut être retirée par chirurgie, les métastases constituent la cause majeure des échecs thérapeutiques. Les efforts thérapeutiques se sont initialement concentrés sur le traitement de la tumeur primaire pour diminuer sa croissance mais depuis peu l'amélioration des traitements a permis, grâce à une détection précoce des cancers, une meilleure prévention du développement métastatique. Toutes les étapes moléculaires permettant à une cellule cancéreuse de s'échapper de la tumeur primaire, d'atteindre la circulation et de se développer dans un nouveau tissu ou organe ne sont pas entièrement connues et de nombreuses questions se posent telles que : Quelles sont les

cellules capables de former des métastases ? Quand et pourquoi sont-elles capables de s'échapper de la tumeur primaire ? Comment peuvent-elles survivre dans la circulation et dans d'autres organes ? Pourquoi ont-elles des sites préférentiels de métastase ? Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait le développement de nouveaux outils diagnostiques ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer.

1. Etapes de la formation des métastases

Les deux théories établies pour décrire le développement du cancer du sein peuvent être de manière générale adaptées à l'ensemble des cancers. De la même manière, deux théories principales s'affrontent pour expliquer la formation de métastases (Klein, 2009). La première est un modèle de progression linéaire basé sur les observations de Leslie Foulds dans les années 50 d'une progression par étapes du cancer (Foulds, 1954). L'autre théorie est un modèle de progression en parallèle des métastases avec la tumeur primaire. Selon ce modèle, la formation des métastases n'est pas la dernière étape de la progression tumorale mais peut s'effectuer précocement. Les cellules métastatiques peuvent se développer dans différents organes où par pression de sélection elles peuvent acquérir des altérations génétiques favorables à leur croissance dans ce tissu et donc présenter des différences avec les cellules de la tumeur primaire (Collins *et al.*, 1956). L'analyse des cinétiques de croissance des tumeurs, des anomalies détectées dans les cellules de la tumeur primaire et dans les cellules métastatiques ainsi que des arguments pour la formation directe de métastases à partir de la tumeur primaire et non à partir d'autres métastases a mis en évidence de nombreux éléments en faveur de la théorie de progression en parallèle (Klein, 2009).

De par le caractère très hétérogène des cellules cancéreuses d'une tumeur, certaines cellules sont capables de réaliser quelques étapes de la progression métastatique mais pas toutes. Seule une très petite proportion de cellules peut effectuer toutes les étapes pour aboutir à la formation de métastases. La formation de métastases est un phénomène complexe et long où chacune des étapes peut être limitante et implique l'acquisition de nouvelles propriétés par les cellules cancéreuses mais aussi la réponse de l'environnement. L'apparition de métastases dépend de l'invasion des tissus entourant la tumeur, de l'entrée des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine ou lymphatique, de leur survie dans la circulation, de la sortie des vaisseaux et de la colonisation d'un nouveau tissu (Figure 4) (Steeg, 2006).

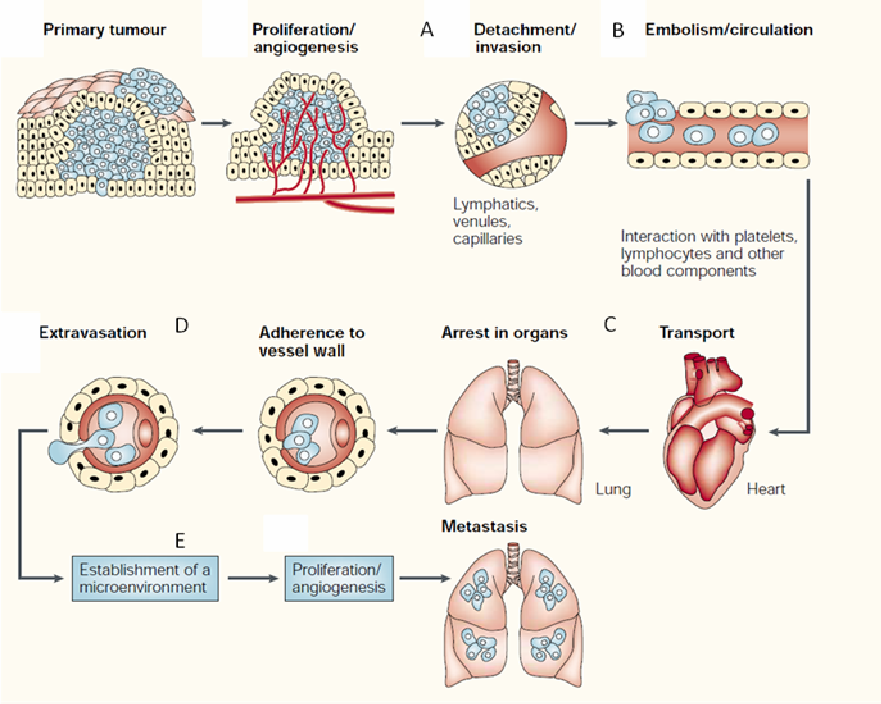


Figure 4 : Illustration des différentes étapes aboutissant à la formation des métastases.

A. Détachement et invasion locale des cellules cancéreuses. B. Passage dans la circulation et survie. C. Transport par la circulation. D. Sortie des vaisseaux. E. Colonisation d'un tissu hôte. D'après Fidler, 2003.

Des études portant sur la dissémination des cellules cancéreuses et la formation des métastases ont montré dans un modèle de cancer du sein une dissémination précoce des cellules cancéreuses avant l'observation du franchissement de la lame basale (Husemann *et al.*, 2008). Il est relativement aisé de comprendre le phénomène de dissémination métastatique dans le modèle de progression linéaire par une acquisition progressive des caractéristiques d'invasivité mais ceci est moins simple dans le cas d'une dissémination précoce. Des analyses génomiques ont permis de démontrer qu'il existait une « signature moléculaire » permettant de prédire le potentiel métastatique d'une tumeur (Liu *et al.*, 2007b; Singh *et al.*, 2002; Sorlie *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002) et donc de préciser le caractère précoce de la formation des métastases. De plus il a été précisé qu'il existe une différence de signature entre la dissémination par voie sanguine ou par voie lymphatique (Woelfle *et al.*, 2003). L'étude des cellules cancéreuses présentes dans la moelle osseuse de patients sans signe de métastases montre que ces cellules sont très hétérogènes alors que cette hétérogénéité diminue lorsque les patients ont des métastases détectées cliniquement (Klein *et al.*, 2002). Bien que les cellules cancéreuses semblent posséder dans la tumeur primaire des caractères permettant de prédire la formation de métastases, l'acquisition des propriétés nécessaires à la formation des métastases

peut s'effectuer au cours du processus métastasique. En effet, l'étude de l'instabilité génétique entre des cellules fortement métastatiques, faiblement métastatiques ou non métastatiques a montré que les cellules hautement métastatiques ont un taux de mutations beaucoup plus élevé que les autres (Cifone and Fidler, 1981). Cependant, l'acquisition des propriétés permettant aux cellules cancéreuses de former des métastases au cours des étapes de la dissémination ou la présence de ces propriétés très tôt dans la tumeur primaire sont encore sujets à débats.

Depuis quelques années, de nombreuses études ont porté sur l'origine des cellules capables de former des métastases et ont fait émerger le concept de cellules souches cancéreuses. Ce concept, initialement développé dans le cadre de cancers hématologiques, a été transposé aux autres cancers. Les cellules souches cancéreuses sont définies comme des cellules ayant la capacité de former une nouvelle tumeur ayant les mêmes caractéristiques que la tumeur d'origine quand elles sont injectées en faible nombre à des souris immuno-déficientes (Lapidot *et al.*, 1994). Ces cellules présentent des caractéristiques proches des cellules souches normales. Il est proposé que ces cellules soient résistantes aux traitements anticancéreux actuels et soient à l'origine des rechutes. Des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans différents types de cancers dont le cancer du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003). L'existence des cellules souches cancéreuses ainsi que leur origine est encore un sujet de débat et leur caractérisation est en cours d'étude (Gupta *et al.*, 2009).

Récemment de nombreuses études ont porté sur l'implication d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui pourrait expliquer le phénomène de dissémination précoce. La transition épithélio-mésenchymateuse est un phénomène réversible qui permet l'acquisition de propriétés de migration et d'invasion de type mésenchymateux par les cellules épithéliales et est sous la dépendance de facteurs de transcription (Yang *et al.*, 2006; Yang and Weinberg, 2008; Yilmaz and Christofori, 2009).

La première étape nécessaire à la dissémination métastatique est la perte des adhérences entre cellules et entre cellules et environnement extracellulaire. L'adhésion des cellules cancéreuses à la matrice extracellulaire est principalement effectuée par des intégrines, protéines transmembranaires capables de transmettre des signaux vers la cellule ou vers le milieu extracellulaire. Les intégrines des cellules non cancéreuses peuvent être échangées contre des intégrines se fixant sur des produits de dégradation de la matrice extracellulaire (Guo and Giancotti, 2004). Lors de l'invasion, une modification de l'expression des cadhérines, permettant l'adhésion entre cellules, s'effectue. La E-cadhérine qui permet l'adhésion entre

les cellules est remplacée par la N-cadhérine qui est normalement exprimée dans les cellules mésenchymateuses et permet la fixation au stroma (Cavallaro and Christofori, 2004). Ces modifications des molécules d'adhésion favorisent le processus d'invasion en permettant le détachement des cellules cancéreuses. Les cellules doivent également recruter des protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire, autorisant ainsi leur migration vers les vaisseaux.

La dissémination de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine est un événement retrouvé chez environ 30 % des patients sans métastases détectables par un marquage de cellules épithéliales dans la moelle osseuse. Il s'agit d'un élément de mauvais pronostic (Pantel *et al.*, 1999; Schlimok *et al.*, 1987). Les cellules cancéreuses sont capables de passer à travers la paroi vasculaire pour rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. Certaines peuvent survivre en suspension dans ce nouvel environnement (inhibition de l'anoïkis) et sortir de la circulation puis atteindre les tissus environnants (Brooks *et al.*, 2010). Toutes ces cellules ne seront pas capables de développer des métastases car elles devront acquérir, souvent après un état de dormance, des propriétés leur permettant de survivre et de proliférer dans un nouveau tissu hôte. L'observation de cellules de mélanome injectées dans la veine porte du foie de souris a permis une meilleur compréhension du phénomène de développement des métastases et a mis en évidence le rôle du microenvironnement (Luzzi *et al.*, 1998). Dans cette étude, 80 % des cellules injectées survivent dans la circulation sanguine du foie et sortent de la circulation trois jours après injection, parmi lesquelles seulement une cellule sur 40 forme des micrométastases et seulement une micrométastases sur 100 continue à proliférer pour former une macrométastase treize jours après l'injection. Une forte proportion de cellules est capable de survivre dans le foie dans un état de dormance et a été retrouvée dans de nombreux types de cancers (Aguirre-Ghiso, 2007; Almog, 2010; Townson and Chambers, 2006). Des clones sont ainsi sélectionnés pour être adaptés à des conditions autres que celles de la tumeur primaire. Ces cellules dormantes sont faiblement prolifératives et pour cela échappent aux traitements et lorsqu'elles sont stimulées pour proliférer peuvent être responsables de récidives. Il est également observé que l'ablation chirurgical de la tumeur primaire peut stimuler la sortie de l'état de dormance des cellules disséminées et ainsi induire la formation de métastases (Demicheli *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 1983; Fisher *et al.*, 1989). Le microenvironnement joue un rôle majeur dans le développement de la prolifération des cellules dormantes.

2. Migration et invasivité des cellules cancéreuses

L'étape de dissémination des cellules cancéreuses de la tumeur primaire dépend de leurs propriétés de migration et de leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire. L'ensemble de ces deux propriétés définit « l'invasivité ». Les cellules doivent mettre en place des mécanismes similaires à ceux utilisés par les cellules non cancéreuses lors de la cicatrisation ou de la circulation des cellules immunitaires pour franchir la lame basale et la matrice extracellulaire qui est une barrière à leur mobilité. La migration des cellules cancéreuses est un phénomène dynamique et implique des interactions avec la matrice extracellulaire, la modification de la forme de la cellule et la génération d'une force permettant de déplacer le corps cellulaire (Friedl and Alexander, 2011). Les cellules peuvent migrer de manière individuelle lorsqu'il n'y a pas de jonction entre cellules ou de manière collective en présence d'adhésion cellule-cellule. Le mécanisme de migration individuelle peut être décomposé en cinq étapes (Friedl and Alexander, 2011) : lors de la première étape, la polymérisation de l'actine permet de polariser le cytosquelette et de former une protrusion de type pseudopode à l'avant de la cellule. Ensuite cette protrusion à l'avant de la cellule développe des adhésions avec la matrice extracellulaire et forme des plaques d'adhésion focale afin de coupler les signaux du microenvironnement au cytosquelette de la cellule. Le recrutement et la sécrétion de protéases permet de dégrader la matrice extracellulaire et de créer un espace dans la matrice extracellulaire autorisant le passage du corps cellulaire. La contraction du complexe actine-myosine permet de générer une force dans la cellule nécessaire à son déplacement. Enfin, cette contraction est accompagnée de la rétractation de l'arrière de la cellule et du recyclage des molécules d'adhésion. Dans le cas d'une migration collective, les cellules de la partie avant du groupement cellulaire effectuent les cinq étapes de la migration individuelle. Elles forment par dégradation protéolytique un espace où la barrière formée par la matrice extracellulaire est rompue ce qui permet aux cellules suivantes d'élargir cet espace et de se déplacer à travers. Dans cette migration collective, les cellules établissent des connexions leur permettant de développer des mécanismes coordonnés pour une migration efficace (Friedl and Alexander, 2011).

Il existe deux types de migration, la migration de type amiboïde et la migration mésenchymateuse. La migration amiboïde est une migration utilisant moins l'adhésion avec la matrice que la migration mésenchymateuse. Les cellules adoptent une morphologie ronde et très déformable qui permet par des cycles d'expansion et de contraction de s'insinuer au travers des espaces vides de la matrice extracellulaire sans utiliser la dégradation

protéolytique. Les cellules cancéreuses à migration amiboïdes sont le plus souvent d'origine hématopoïétique ou neuroectodermique (Friedl and Wolf, 2003). Au contraire de la migration amiboïde, la migration mésenchymateuse fait intervenir des zones d'adhésion et utilise une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Les cellules utilisant une migration mésenchymateuse ont une forme allongée de type fibroblaste et laissent après leur passage une zone où la matrice extracellulaire est dégradée. Ce type de migration est retrouvé dans les sarcomes et les cancers épithéliaux différenciés (Friedl and Wolf, 2003). La vitesse de migration mésenchymateuse est limitée par le recyclage des molécules d'adhésion, il existe donc une relation inverse entre la force de l'adhésion focale et la vitesse de migration. Pour la migration amiboïde le facteur limitant est la taille du noyau qui est très rigide et ne peut pas se déformer. La vitesse moyenne de migration mésenchymateuse est de 0,1 à 1 µm / min. La migration amiboïde qui ne nécessite pas d'adhésion peut s'effectuer à une vitesse plus rapide de 0,1 à 20 µm / min (Friedl and Wolf, 2003).

Afin d'interagir avec la matrice extracellulaire et de transmettre vers la cellule des signaux provenant de la matrice, les cellules développent des protrusions d'actine variées en terme de composition et de dynamique telles que les lamellipodes, les pseudopodes, les filopodes, ou les invadopodes (Ridley, 2011; Wolf and Friedl, 2009). La formation de ces structures dépend de la matrice et de l'environnement extracellulaire. Les cellules dans un environnement en deux dimensions (comme lorsque les cellules cancéreuses adhèrent à un vaisseau) forment à leur bord avant un lamellipode qui définit un front de migration. Des filopodes peuvent se développer sur le coté des cellules et le long des lamellipodes. Ces protrusions sont courtes et d'une dynamique rapide permettant de « sentir » le microenvironnement. Lorsque les cellules sont dans un environnement en trois dimensions, elles forment dans la direction du mouvement des pseudopodes qui ont une activité de traction. Les invadopodes sont des structures riches en F-actine capables de dégrader la matrice extracellulaire. Ils sont retrouvés sur la face ventrale des cellules cancéreuses invasives cultivées *in vitro* sur une matrice en deux dimensions. Leur existence dans un environnement en trois dimensions et *in vivo* est en cours d'étude (Linder *et al.*, 2011; Saltel *et al.*, 2011; Yu and Machesky, 2012).

La régulation de l'invasivité des cellules cancéreuses implique l'organisation du cytosquelette, la capacité à dégrader la matrice extracellulaire et les adhésions entre cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire. L'activation de l'invasion peut être régulée par des facteurs présents dans l'environnement et libérés par la protéolyse de la matrice

extracellulaire ou sécrétés par les cellules cancéreuses telles que des chimiokines, des cytokines ou des facteurs de croissance (Friedl and Wolf, 2003,2010; Friedl and Alexander, 2011). Les cellules cancéreuses sont connues pour s'adapter à l'environnement, par conséquent elles peuvent passer d'un type de migration à l'autre en modifiant l'adhésion entre cellules ou avec l'environnement, la force générée via le cytosquelette ou la protéolyse de la matrice extracellulaire (Friedl and Wolf, 2003). Cette adaptation des cellules cancéreuses pourrait expliquer l'échec actuel des essais cliniques de molécules inhibitrices de protéases dans le traitement du cancer (Overall and Kleifeld, 2006).

Des techniques plus ou moins sophistiquées ont été développées afin d'étudier *in vitro* le phénomène d'invasivité cellulaire (Schoumacher *et al.*, 2011). La migration cellulaire peut être évaluée par le passage des cellules à travers un filtre possédant des pores de 8 µm alors que pour la détermination de l'invasivité cellulaire, ce même filtre peut être recouvert d'une fine couche mimant la matrice extracellulaire (par exemple du Matrigel™). Les cellules doivent d'abord dégrader le Matrigel™ avant de traverser les pores. La culture de cellules sur une fine couche de gélatine ou de Matrigel™ permet l'étude de la dégradation d'une matrice extracellulaire et des invadopodes. Récemment une méthode de culture de cellules sur des membranes basales natives de péritoine de rat permet de s'approcher au plus près de la structure de l'environnement extracellulaire (Hotary *et al.*, 2006; Schoumacher *et al.*, 2010). Des modèles de culture de cellules en trois dimensions sont de plus en plus utilisés afin de représenter au mieux l'environnement d'une tumeur.

3. Acteurs de l'invasion et rôle du microenvironnement

Les cellules cancéreuses sont entourées d'un environnement tumoral composé d'une matrice extracellulaire et de cellules stromales telles que des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules immunitaires ou encore des adipocytes. Elles sont continuellement en contact avec l'environnement tumoral avec lequel elles établissent des communications étroites et des échanges.

a) Sites préférentiels de développement des métastases

Il est connu depuis longtemps que certaines tumeurs primaires sont associées à des organes spécifiques où se développent des métastases. Les cancers du sein forment le plus souvent des métastases dans les os, le foie et les poumons alors que les cancers de la prostate métastasent

principalement dans les os. Cette observation a conduit le chirurgien anglais Stephen Paget à émettre l'hypothèse « Seed and soil » : il s'agit d'une préférence d'organe pour la formation des métastases en fonction de la tumeur primaire et d'une interaction favorable entre une cellule cancéreuse métastatique et un environnement (Paget, 1989). Paget représente les métastases comme une graine (seed) qui doit pour se développer être plantée dans une terre (soil) favorable. L'environnement tumoral joue donc un rôle majeur dans le développement des tumeurs et des métastases.

Les cancers du sein et de la prostate métastasent fortement au niveau des os. Alors que les métastases de cancers de la prostate sont plutôt ostéoblastiques et stimulent la formation d'os par les ostéoblastes, les métastases du cancer du sein sont principalement ostéoclastiques en stimulant la dégradation de l'os par les ostéoclastes. Les cellules cancéreuses présentes dans le microenvironnement osseux produisent la protéine PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) qui induit la résorption de l'os par les ostéoclastes. La dégradation de l'os libère des facteurs de croissances tels que le TGF-β (Transforming growth factor β) ou l'IGF1 (insulin-like growth factor 1) qui stimulent la prolifération des cellules cancéreuses. La production plus importante de PTHrP par les cellules cancéreuses conduit à l'établissement d'une boucle de stimulation entre le microenvironnement osseux et les cellules cancéreuses (Mundy, 2002).

Récemment, le concept de niche pré-métastatique a émergé. Dans ce modèle, la sécrétion de facteurs tels que SDF1 (Stromal cell-derived factor-1), le TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), le VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A) ou le PlGF (Placental growth factor) par les cellules cancéreuses permet la sécrétion de molécules induisant le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse dont des cellules progénitrices hématopoïétiques et des cellules myéloïdes qui sont impliquées dans la formation de la niche pré-métastatique. Les cellules cancéreuses métastatiques viennent alors coloniser la niche précédemment formée (Kaplan *et al.*, 2005; Peinado *et al.*, 2011)

b) Rôle du système immunitaire

Une étude génomique a permis de démontrer que 510 gènes étaient exprimés différemment entre le centre de la tumeur et le bord invasif. Parmi ces gènes 75 % sont surexprimés dans le bord de la tumeur dont des gènes impliqués dans l'invasion et dans l'inflammation (Hlubek *et al.*, 2007). Cette étude suggère que les cellules de la périphérie de la tumeur recrutent, par des

signaux inflammatoires, les cellules immunitaires qui, stimulées par les cellules cancéreuses, peuvent induire l'expression de gènes nécessaires à l'invasivité des cellules cancéreuses. Le système immunitaire possède un rôle paradoxal dans le développement des tumeurs. Bien qu'il ait pour but premier de détecter et de détruire les éléments étrangers de l'organisme, l'infiltration des tumeurs par des macrophages est un signe de mauvais pronostic et d'une progression rapide des tumeurs (Talmadge, 2011). En effet, il est connu que lors du phénomène de cicatrisation, les macrophages et les neutrophiles expriment des facteurs pro-angiogéniques, des facteurs de croissance et des protéases. Ce phénomène s'il est mis en place dans les tumeurs pourrait expliquer l'effet bénéfique du système immunitaire sur la croissance tumorale. Il a été démontré que les cellules immunitaires permettaient de favoriser la progression tumorale en apportant aux cellules cancéreuses des facteurs de croissance, des facteurs de survie limitant la mort cellulaire, des facteurs pro-angiogéniques et des enzymes nécessaires à l'angiogenèse et à l'invasivité (Grivennikov *et al.*, 2010; Karnoub and Weinberg, 2006; Qian and Pollard, 2010). Par exemple les macrophages expriment le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor EGF) qui stimule l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires. Le facteur stimulant les colonies 1 (colony stimulating factor 1 CSF-1) sécrété par les cellules cancéreuses augmente l'expression d'EGF par les macrophages induisant ainsi la mise en place d'une boucle favorable à l'invasivité des cellules cancéreuses (Goswami *et al.*, 2005). De telles coopérations entre cellules de l'environnement et cellules cancéreuses sont retrouvées dans les sites de formation des métastases et pourraient contribuer à la formation des métastases dans des sites spécifiques. Les cellules cancéreuses mammaires expriment le récepteur de chimiokine CXCR4 et son ligand CXCL12 (SDF1) est exprimé dans les organes où les cellules cancéreuses mammaires métastasent préférentiellement. La fixation de CXCL12 sur le récepteur CXCR4 induit des voies de signalisation favorisant l'invasion et la formation des métastases (Muller *et al.*, 2001).

c) Rôle des communications avec le microenvironnement

Les protéines de la matrice extracellulaire peuvent transmettre des signaux vers les cellules grâce aux intégrines présentes à leurs surfaces. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires composés de chaînes α et β qui servent de lien entre le cytosquelette et des ligands extracellulaires de la matrice extracellulaire. Chaque type d'intégrine interagit avec un ligand de la matrice extracellulaire qui après connexion au cytosquelette par des molécules

adaptatrices telles que la talin ou la paxillin stimule des voies de signalisation de la FAK (Focal adhesion kinase), des kinases de la famille src ou encore des petites GTPases Rho et Rac pour réguler la prolifération, la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses (Guo and Giancotti, 2004). Les composants de la matrice extracellulaire peuvent également être reliés au cytosquelette via CD44 (le récepteur de l'acide hyaluronique), le discoidin domain récepteur DDR1 et DDR2 ou des protéoglycanes tels que le syndecan, le glypican et la neuropilin. Tous ces systèmes participent à l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et convergent vers des voies de signalisation responsables de la transmission du signal extracellulaire vers la cellule (Friedl and Alexander, 2011).

d) Rôle des protéases

L'expression de nombreuses protéases est augmentée dans les cellules cancéreuses afin de participer au phénomène d'invasion de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases matricielles (MMP), les ADAM (A Disintegrin and metalloproteinase), les protéases à sérine, les cathepsines à cystéine et à aspartate ainsi que l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et son récepteur (uPAR) sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Blasi and Sidenius, 2010; Kessenbrock *et al.*, 2010; Mohamed and Sloane, 2006). Parmi les protéases les plus étudiées, les métalloprotéinases matricielles sont des endopeptidases dépendantes du zinc capables de cliver tous les composants de la matrice extracellulaire. Ces protéases sont surtout synthétisées par les cellules stromales. Toutes les MMP sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs contenant un pro-domaine. Leur activation nécessite une délocalisation physique du pro-domaine du site catalytique par un clivage protéolytique par d'autres protéases (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Ra and Parks, 2007). Les MMP sont généralement sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles sont activées pour dégrader la matrice extracellulaire. Certaines MMP sont associées à la membrane plasmique (MT-MMP) où elles dégradent la matrice extracellulaire d'une manière plus localisée que les MMP sécrétées et peuvent participer à l'activation de MMP solubles. Les cathepsines sont également des protéases fortement impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles sont séparées en trois groupes en fonction de l'acide aminé présent dans leur site actif : cystéine, aspartyl et sérine. Les cathepsines sont localisées dans les lysosomes et les endosomes où le milieu acide est favorable à leur activité, elles peuvent également être sécrétées dans l'environnement

extracellulaire (Brix *et al.*, 2008). Toutes ces protéases peuvent être sécrétées par les cellules cancéreuses, être présentes à leur surface ou provenir des cellules stromales comme les macrophages ou les fibroblastes (Mason and Joyce, 2011). Elles contribuent à l'augmentation de l'invasivité par plusieurs mécanismes (Egeblad and Werb, 2002; Mason and Joyce, 2011):

- ✓ La dégradation de la matrice extracellulaire permet son remodelage, nécessaire à la migration des cellules cancéreuses.

- ✓ La protéolyse de la matrice extracellulaire induit la libération de facteurs de croissance ou de chimiokines présents dans la matrice mais également de molécules ou de fragments de matrice ayant un rôle de régulation de l'adhésion ou de l'invasion.

- ✓ Leur activité de protéolyse est impliquée dans l'inhibition ou l'activation d'autres protéines telles que l'activation d'autres protéases, de facteurs de croissance, de récepteurs ou de protéines membranaires. Les protéases peuvent également moduler des facteurs anti et pro-angiogéniques, la balance entre ces deux types de facteurs déterminant l'extension de l'angiogenèse.

Du fait des multiples rôles des protéases dans la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire, celles-ci ne sont pas seulement impliquées dans l'invasivité des cellules cancéreuses mais également dans la croissance tumorale (via l'activation ou la libération de facteurs de croissance ou de signaux pro ou anti-apoptotiques) ou dans l'angiogenèse.

La dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire est un phénomène complexe qui implique de multiples voies de régulation entre protéases et entre inhibiteurs endogènes, permettant d'activer de nombreuses protéases en cascade (Mason and Joyce, 2011).

e) Rigidité de la matrice extracellulaire et rôle des invadopodes

Les mécanismes de migration cellulaire et d'invasivité dépendent non seulement des propriétés des cellules cancéreuses mais aussi de la structure de la matrice extracellulaire. La forte densité des réseaux de fibres ou au contraire un réseau lâche, l'orientation des fibres, la composition de la matrice ou encore la rigidité de la matrice sont autant de paramètres qui peuvent influer sur les modes de migration des cellules cancéreuses et leur invasivité (Friedl and Wolf, 2010). Ainsi, dans le cancer du sein, une corrélation a été mise en évidence entre la

densité du tissu mammaire et l'augmentation du risque de cancer (Boyd *et al.*, 2005). Il est également démontré que les tissus cancéreux sont plus rigides que les tissus normaux (Paszek *et al.*, 2005; Samani *et al.*, 2007). De plus, l'augmentation de l'expression du collagène dans un modèle de cancer du sein chez la souris favorise la formation de tumeurs, l'invasivité et l'apparition de métastases (Provenzano *et al.*, 2008).

Les cellules cancéreuses sont capables de former, lorsqu'elles sont au contact d'un substrat en deux dimensions, des invadopodes sur leur face ventrale. Ces structures sont riches en F-actine et sont spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui les distingue des autres structures d'adhésion. Les invadopodes ont été initialement décrits dans des fibroblastes transformés par le virus de Rous (David-Pfeuty and Singer, 1980; Tarone *et al.*, 1985), puis des structures similaires nommées podosomes ont été décrites dans des cellules normales connues pour remodeler l'environnement extracellulaire telles que les ostéoclastes (Oreffo *et al.*, 1988; Zambonin-Zallone *et al.*, 1988), les macrophages (Linder *et al.*, 1999; Messier *et al.*, 1993), les cellules dendritiques (Binks *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 2001), les cellules endothéliales (Moreau *et al.*, 2003) et les cellules musculaires lisses (Burgstaller and Gimona, 2005). Bien que ces structures partagent avec les invadopodes leurs propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire et leur composition riche en F-actine ils diffèrent en terme de composition, de taille ou encore de durée de vie (Artym *et al.*, 2011; Buccione *et al.*, 2004; Linder, 2009; Weaver, 2006). Il n'existe pas de marqueurs précis des invadopodes, ils sont caractérisés par des zones riches en actine ou en protéines associées et par la dégradation de la matrice extracellulaire. Ils sont riches en intégrines et sont capables de sécréter des protéases solubles ou d'apporter des protéases membranaires sur une zone précise permettant une dégradation focalisée de la matrice extracellulaire. La revue du paragraphe II.D décrit l'influence du pH et des régulateurs du pH sur les invadopodes et les podosomes.

Il a récemment été démontré que la rigidité de la matrice extracellulaire augmente le nombre et l'activité des invadopodes d'une manière dépendante des protéines responsables de la détection d'un signal mécanique (Alexander *et al.*, 2008). Il a été observé une localisation des formes actives de ces protéines détectrices FAK et $p130^{Cas}$ dans les invadopodes ayant une activité de dégradation intense, et une augmentation de la dégradation associée aux invadopodes lorsqu'elles sont surexprimées (Alexander *et al.*, 2008; Parekh and Weaver, 2009). Ces résultats, complétés par l'analyse de la rigidité de différents substrats et de la fonction de dégradation des invadopodes (Parekh *et al.*, 2011) permettent de mettre en

évidence l'importance de la rigidité du microenvironnement et le rôle de mécano-senseurs des invadopodes. Les propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire sont donc capables de moduler l'activité de structures spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et de favoriser l'invasivité des cellules cancéreuses. Ceci corrobore l'observation de la corrélation entre densité du tissu mammaire et risque de cancer du sein. Les podosomes, structures proches des invadopodes présents dans les cellules normales, sont également sensibles à la rigidité de la matrice extracellulaire (Collin *et al.*, 2006; Collin *et al.*, 2008).

Ces différentes études mettent en évidence le rôle majeur du microenvironnement dans l'agressivité des cellules cancéreuses et dans la formation des métastases. Ces paramètres permettent de favoriser ou non la dissémination des cellules cancéreuses mais également de déterminer le mode de migration utilisé. Le choix du substrat utilisé pour mimer la matrice extracellulaire *in vitro* est donc d'une grande importance pour reproduire au mieux les propriétés de l'environnement tumoral.

F. Métabolisme des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses ont besoin de produire l'énergie nécessaire à leur survie mais également des intermédiaires pour les synthèses des molécules nécessaires à leur prolifération accrue. D'une manière générale, le métabolisme énergétique des sucres s'effectue soit par la glycolyse suivie par la réduction du pyruvate en lactate soit par un couplage entre glycolyse et phosphorylations oxydatives dans la mitochondrie.

La glycolyse est une voie du catabolisme permettant à partir de 10 réactions enzymatiques, qui se déroulent dans le cytoplasme des cellules, la dégradation du glucose en pyruvate. Ces réactions utilisent une molécule de glucose, deux ATP (adénosine 5'-triphosphate) et 2 coenzymes oxydés NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) pour former 2 molécules de pyruvate, 4 ATP et 2 coenzymes réduits NADH, H^+. L'équation globale des réactions aboutit à la formation de 2 pyruvates, 2 ATP et 2 coenzymes NADH, H^+. Le cycle de Krebs permet l'oxydation du pyruvate en 8 étapes par les enzymes mitochondriales après transport du pyruvate dans la mitochondrie puis transformation en acétylCoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'oxydation du pyruvate par le cycle de Krebs permet la formation de coenzymes réduits soit pour une molécule de pyruvate : 3 CO_2, 4 NADH, H^+, 1 $FADH_2$

(Flavine adénine dinucléotide) et 1 GTP (guanosine triphosphate). L'ensemble des coenzymes réduits au cours de la dégradation du glucose seront utilisés et régénérés par la chaîne de transport des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale jusqu'à la réduction d'oxygène en eau. Le transport des électrons s'accompagne de la formation d'un gradient de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie dont l'énergie servira à la formation d'ATP par une ATP synthase. L'oxydation complète d'une molécule de glucose par le couplage entre la glycolyse et les phosphorylations oxydatives de la chaîne mitochondriale utilise 6 H_2O et 12 coenzymes oxydés pour former 6 CO_2 (dioxyde de carbone) avec un bilan énergétique pour un glucose de 38 ATP. Le système de phosphorylations oxydatives dépend de la présence de coenzymes et ne peut s'effectuer qu'en présence d'oxygène.

En hypoxie, la limitation d'oxygène comme accepteur final de la chaîne respiratoire mitochondriale ralenti fortement les phosphorylations oxydatives. Au lieu de servir de substrat au cycle de Krebs, le pyruvate est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) selon l'équation suivante : pyruvate + NADH + H^+ ↔ lactate + NAD^+. L'oxydation du glucose par la glycolyse anaérobie aboutit à la formation de 2 lactates avec un rendement énergétique de 2 ATP. Elle permet également la régénération de NAD^+ nécessaire à la glycolyse. Le métabolisme énergétique est finement régulé en présence d'oxygène par un rétrocontrôle négatif des enzymes de la glycolyse par les métabolites énergétiques dont l'ATP, le glucose-6-phosphate ou le citrate (Porporato *et al.*, 2011). Cette régulation appelée effet Pasteur permet d'accélérer le flux glycolytique lorsque la phosphorylation oxydative diminue (quand l'oxygène diminue) et inversement de diminuer le flux glycolytique en présence d'oxygène et donc d'améliorer le couplage entre glycolyse et phosphorylations oxydatives qui est plus favorable énergétiquement pour la majorité des cellules différenciées (Racker, 1974).

Métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses

Afin de s'adapter à leur environnement hypoxique et face à une demande d'énergie nécessaire à la prolifération cellulaire, les cellules cancéreuses ont un métabolisme énergétique glycolytique non couplé aux phosphorylations oxydatives. Contrairement aux cellules non cancéreuses, la glycolyse est la source principale d'énergie dans les cellules cancéreuses. 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). L'observation d'une production de lactate par les cellules cancéreuses à permis à Otto Warburg (prix Nobel de physiologie et médecine en 1931 pour ses travaux sur les enzymes de la respiration) d'émettre l'hypothèse qu'un cancer pourrait être dû à une altération du fonctionnement des mitochondries conduisant à la mise en place d'un métabolisme glycolytique (Warburg, 1956). Bien que l'effet Warburg ait été démontré de nombreuses fois, l'hypothèse n'a pu être vérifiée. Le développement de l'imagerie de l'entrée de glucose dans les tumeurs par tomographie par émission de positons (PET) à l'aide d'un traceur analogue du glucose, le 18-fluorodésoxyglucose (FDG-PET), a permis de montrer la forte consommation de glucose dans les tumeurs comparées aux tissus normaux (Gambhir, 2002; Hawkins and Phelps, 1988; Weber *et al.*, 1999). Cette technique a permis de développer un outil diagnostic très sensible pour identifier les tumeurs et les métastases. De même, il a été retrouvé dans plusieurs types de cancers 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). Ces deux marqueurs, consommation de glucose et production de lactate sont corrélés aux chances de survie des patients. Une forte consommation de glucose est un facteur de mauvais pronostic (Lopez-Rios *et al.*, 2007; Mankoff *et al.*, 2007) de même qu'une concentration de lactate élevée dans les tumeurs (Brizel *et al.*, 2001; Quennet *et al.*, 2006; Walenta *et al.*, 1997; Walenta *et al.*, 2004). Les mesures de lactate ne sont pas encore utilisées en clinique mais elles devraient permettre le développement d'outils diagnostiques et pronostiques prometteurs.

Pourquoi les cellules cancéreuses développent un métabolisme glycolytique ?

Cette préférence des cellules cancéreuses pour un métabolisme glycolytique est contraire à ce que pourraient prédire les rendements en ATP entre glycolyse et phosphorylations oxydatives avec un rendement 19 fois plus important pour les phosphorylations oxydatives. Les contraintes énergétiques des cellules cancéreuses sont telles qu'elles doivent produire assez d'énergie pour survivre en présence de nutriments limités et produire également assez d'intermédiaires métaboliques pour les voies de synthèses des acides gras, acides aminés et acides nucléiques nécessaires à leur prolifération.

Dans les cellules normales différenciées, la demande en carbone et en énergie est plus faible comparée aux cellules en prolifération. En présence d'oxygène, les cellules différenciées utilisent les phosphorylations oxydatives comme source principale d'énergie, le lactate est seulement produit en absence d'oxygène. Les cellules en prolifération ainsi que les cellules cancéreuses ayant une forte prolifération utilisent un métabolisme glycolytique et produisent du lactate avec ou sans oxygène ce qui leur confèrent un avantage favorable pour leur croissance (Vander Heiden *et al.*, 2009). Par exemple dans les lymphocytes (Wang *et al.*, 1976) et les thymocytes (Brand and Hermfisse, 1997) la forte demande en acides nucléiques pour la synthèse d'ADN lors des phases S, G2 et M du cycle cellulaire est apportée par une diminution de l'activité mitochondriale et la mise en place d'un métabolisme de glycolyse aérobie. Le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses permet aux carbohydrates d'être redirigés vers les voies de synthèses des biomolécules et donc de favoriser la prolifération cellulaire et la croissance des tumeurs. A partir des carbohydrates produits par la glycolyse, la voie des pentoses phosphates permet la synthèse des acides nucléiques et la production de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Le pyruvate permet de fournir des substrats pour la voie de synthèse de l'alanine et les intermédiaires du cycle de Krebs sont exportés de la mitochondrie vers le cytosol pour intervenir dans la synthèse des lipides et des acides aminés (Dhup *et al.*, 2012; Vander Heiden *et al.*, 2009). L'autre source d'énergie et de carbone des cellules cancéreuses en plus du glucose est la glutamine qui est fortement consommée par les cellules cancéreuses. Il a été proposé que le glucose soit principalement utilisé pour la synthèse des lipides et des nucléotides alors que la glutamine sert de substrat au cycle de Krebs pour la production d'acides aminés et de l'azote nécessaires aux cycles purine et pyrimidine des acides nucléiques (DeBerardinis *et al.*, 2007).

Récemment, a émergé un nouveau modèle dans lequel la production de lactate est également utilisée pour établir une symbiose entre deux types de cellules cancéreuses, les cellules glycolytiques et les cellules oxydatives. Dans ce modèle, le lactate produit par les cellules glycolytiques, hypoxiques au centre de la tumeur, ou par les cellules du stroma, est transporté par des transporteurs proton-lactate (monocarboxylates transporteurs MCT) vers les cellules oxygénées situées à proximité des vaisseaux afin d'y être utilisé comme substrat du cycle de Krebs après transformation en pyruvate par la lactate déshydrogénase (Bonuccelli *et al.*, 2010; Feron, 2009; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2011; Sonveaux *et al.*, 2008; Whitaker-Menezes *et al.*, 2011). La préférence des cellules oxydatives pour utiliser le lactate au lieu du glucose permet la diffusion du glucose jusqu'aux cellules glycolytiques qui assureront la conversion

en lactate (Figure 5). Ce phénomène de symbiose énergétique entre deux cellules n'est pas seulement restreint aux cellules cancéreuses mais existe aussi dans les muscles (Brooks, 2000), et entre les astrocytes et les neurones (Pellerin, 2003). Le lactate peut également être recyclé par le cycle de Cori dans le foie ou servir de messager vers les autres cellules. Le cycle de Cori permet de transformer le lactate circulant dans le sang en glucose par la néoglucogenèse, glucose qui peut repasser dans la circulation sanguine et de nouveau alimenter les tissus, dont la tumeur (Cori, 1981).

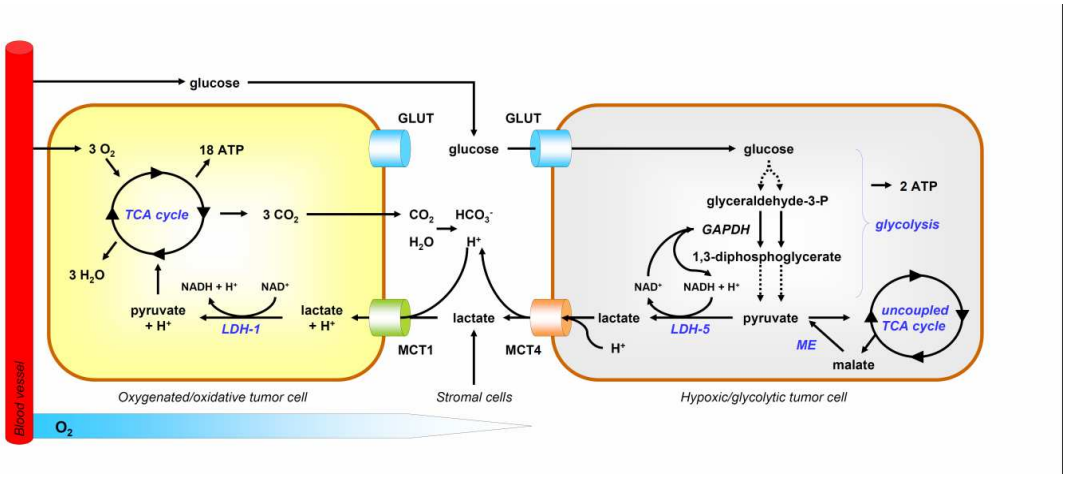


Figure 5 : Modèle de symbiose entre cellules cancéreuses glycolytiques et oxydatives.
D'après Dhup *et al.*, 2012.

Comment le métabolisme glycolytique se met en place dans les cellules cancéreuses ?

Lors des premières descriptions du métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses, cette dérégulation du métabolisme comparée aux cellules non cancéreuses était expliquée par la sélection des cellules glycolytiques par l'environnement hypoxique de la tumeur. Or, des cellules glycolytiques sont retrouvées dans des cellules leucémiques (Elstrom *et al.*, 2004) ou dans des cellules cancéreuses pulmonaires oxygénées (Nolop *et al.*, 1987). Le métabolisme glycolytique, apparaît alors comme un caractère des cellules cancéreuses lié à l'activation d'oncogènes ou à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs. La mise en place de la glycolyse aérobie est un phénomène complexe encore mal compris qui fait intervenir de nombreuses voies de régulation qui peuvent se croiser.

Une récente étude a montré une augmentation de l'expression des principales protéines du métabolisme glycolytique dans les cellules cancéreuses (Lu *et al.*, 2007). Un des responsables

majeurs de l'établissement du métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses est le facteur de transcription HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α) qui dans les cellules cancéreuses est activé soit par l'environnement hypoxique soit par une mutation directe ou une mutation dans les voies le rendant constitutivement actif. HIF-1α est capable d'activer la transcription de gènes, via des éléments de réponse à l'hypoxie, codant pour des enzymes du métabolisme (Porporato *et al.*, 2011; Semenza, 1996; Tennant *et al.*, 2009) telles que la lactate déshydrogénase A (LDHA) (Semenza *et al.*, 1996), la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) qui empêche l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie via une inhibition de la Pyruvate déshydrogénase (PDH, transforme le lactate en acétylCoA) (Kim *et al.*, 2006; Papandreou *et al.*, 2006), l'hexokinase II (Yasuda *et al.*, 2004) ainsi que GLUT1 qui augmente l'entrée du glucose dans les cellules (Chen *et al.*, 2001). Les effets de HIF-1α conduisent à une augmentation de la disponibilité du glucose et à une accélération du flux glycolytique. Le facteur de transcription HIF-1α est également impliqué dans la transcription de gènes de la vascularisation, de la migration, de la survie, de la croissance et de la régulation du pH (Semenza, 2003). En présence d'oxygène et de 2-oxoglutarate, la prolyl hydroxylase PHD2 considérée comme un senseur d'O_2 induit la dégradation de HIF-1α par le protéasome. En absence d'oxygène la PHD2 n'est pas active ce qui permet la stabilisation de HIF-1α. Le pyruvate issu de la conversion du lactate peut entrer en compétition avec le 2-oxoglutarate et conduire à l'inhibition de la PHD2 qui induit la stabilisation de HIF-1α même en présence d'oxygène (Lu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005a). Cette voie induit une boucle de régulation favorable à la mise en place d'un métabolisme glycolytique. En plus de HIF-1α, les voies de signalisation de c-myc, AMPK (5' AMP-activated protein kinase), p53, ou encore mTOR (mammalian target of rapamycin) sont capables d'accélérer le flux glycolytique (Porporato *et al.*, 2011). Des facteurs de croissance sont également impliqués dans la régulation de l'activité d'enzymes de la glycolyse telle que la pyruvate kinase M2 (PKM2) (Christofk *et al.*, 2008a; Christofk *et al.*, 2008b). Des mutations sur des gènes codants pour des enzymes du cycle de Krebs comme par exemple pour la succinate déshydrogénase et la fumarate hydratase (Baysal, 2003; Pollard *et al.*, 2003) ou encore l'isocitrate déshydrogénase (Parsons *et al.*, 2008) ou des altérations du fonctionnement mitochondrial (Ortega *et al.*, 2009) sont également retrouvées.

La glycolyse aérobie aboutit à la formation de lactate comme produit final. Il ne doit pas être seulement considéré comme un déchet de la glycolyse, il a également un rôle d'intermédiaire de signalisation qui lui permet d'avoir un rôle majeur dans les phénomènes liés aux propriétés

des cellules cancéreuses (Dhup *et al.*, 2012). L'ajout de 20 mM de lactate pendant 6h dans le milieu de culture de myocytes L6 induit la transcription de 673 gènes et la diminution de la transcription de seulement 3 gènes (Hashimoto *et al.*, 2007). Parmi les gènes transcrits plusieurs groupes ont été mis en évidence dont des gènes codant pour des protéines du métabolisme et des mitochondries, des protéines de l'activation de la transcription et de la transduction du signal, des transporteurs, du stress oxydant, de l'apoptose, de la croissance cellulaire et de la signalisation calcique. Enfin le lactate est capable de servir de substrat pour le métabolisme des cellules cancéreuses oxydatives (Sonveaux *et al.*, 2008) et de stimuler l'angiogenèse (Vegran *et al.*, 2011). Afin de stimuler l'angiogenèse, le lactate entre dans les cellules endothéliales à l'aide d'un transporteur MCT1 et stimule la voie NF-κB qui induit l'augmentation de transcription de plusieurs gènes dont celui de la cytokine IL-8 favorisant la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes (Vegran *et al.*, 2011). Le lactate peut également inhiber la réponse du système immunitaire (Fischer *et al.*, 2007).

L'utilisation de molécules antidiabétiques ciblant le métabolisme du glucose, telle que la metformine, montre un bénéfice en terme de prévention du cancer et une augmentation de la survie (Gallagher and LeRoith, 2011). Une meilleure compréhension des mécanismes associés à la dérégulation du métabolisme dans les cellules cancéreuses et à sa place dans le métabolisme de l'organisme entier permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur ces principes. Enfin, une meilleure prise en charge de la cachexie associée au cancer (qui peut être expliquée par un excès de consommation de glucose par les tumeurs) pourrait être assurée. Certains composés sont en cours d'essais cliniques telles que des molécules ciblant les transporteurs du glucose, la LDH, la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), le transporteur MCT1, les facteurs de transcription HIF-1α et c-myc ainsi que la kinase AMPK (5' AMP-activated protein kinase) (Porporato *et al.*, 2011).

L'acide lactique est exporté en dehors de la cellule pour éviter une acidification intracellulaire et la mort de la cellule. La production et l'export de lactate est telle que la concentration en lactate dans les tumeurs peut atteindre 40 mM avec un niveau moyen de 10 mM (Brizel *et al.*, 2001; Walenta and Mueller-Klieser, 2004). L'acide lactique étant dissocié dans l'environnement tumoral est considéré comme une source importante de l'acidification du milieu tumoral qui est un avantage pour l'invasivité des cellules.

II. Régulation du pH des cellules cancéreuses

Il est connu depuis de nombreuses années que l'environnement extracellulaire des tumeurs est particulièrement riche en protons d'où son pH acide. Les différents acides métaboliques produits par les cellules cancéreuses sont expulsés hors des cellules et sont responsables de l'acidification du milieu extracellulaire (pH_e) accompagnée d'une alcalinisation du milieu intracellulaire (pH_i). Ce gradient de pH anormal retrouvé dans les cellules cancéreuses est favorable à leur fonctionnement, incluant la prolifération et la dissémination métastatique.

A. pH des cellules cancéreuses

Dans les cellules normales différenciées, le pH intracellulaire est généralement compris entre 6,9 et 7,2 et le pH extracellulaire entre 7,2 et 7,4. Des études d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ont permis de mesurer le pH extracellulaire de tumeurs et de déterminer qu'il est compris entre 6,2 et 6,8 alors que le pH intracellulaire des cellules cancéreuses se situe entre 7,2 et 7,7 (Cardone *et al.*, 2005b; Gallagher *et al.*, 2008; Gillies *et al.*, 2002). Les cellules cancéreuses présentent donc un gradient de pH inverse par rapport aux cellules non cancéreuses : leur milieu intracellulaire est plus alcalin et leur environnement extracellulaire est plus acide. Une forte production de protons et leur exportation vers l'environnement extracellulaire sont responsables de l'établissement de ce gradient de pH des cellules cancéreuses.

La production de lactate par le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses est connue pour être un des responsables majeurs de la forte production de protons des cellules cancéreuses. Il a été démontré qu'une hyperglycémie expérimentale induit une acidification du microenvironnement tumoral (Dellian *et al.*, 1996; Jahde and Rajewsky, 1982; Volk *et al.*, 1993) accompagnée d'une augmentation de la concentration en lactate dans la tumeur, reflet du métabolisme glycolytique (Jain *et al.*, 1984). De plus, la production de protons est plus importante et le pH plus acide dans des cellules cancéreuses possédant un métabolisme de glycolyse aérobie comparée à celles utilisant les phosphorylations oxydatives (Schornack and Gillies, 2003). Le métabolisme glycolytique et la production d'acide lactique par les cellules cancéreuses semblent donc importants pour la mise en place d'un microenvironnement acide

mais ce n'est pas la seule source de protons. En effet, des tumeurs murines dérivées de cellules déficientes pour la lactate déshydrogénase (LDH) ou pour le transport de glucose et la phosphoglucose isomérase développent un microenvironnement tumoral acide (Newell *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1998). De plus, une restriction du flux sanguin de la tumeur dans un modèle d'ischémie-reperfusion stoppe la production de lactate mais le microenvironnement continue à s'acidifier (Parkins *et al.*, 1997). Des études utilisant des cellules sélectionnées pour être déficientes en transport de glucose et en phosphoglucose isomérase, ont permis de proposer le CO_2 comme autre source d'acidité dans les tumeurs (Helmlinger *et al.*, 2002). L'acide carbonique H_2CO_3 également produit au cours du métabolisme énergétique peut, associé aux anhydrases carboniques, être une source d'acidité pour l'environnement extracellulaire. Afin de lutter contre cette production de protons par le métabolisme, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes permettant l'efflux de protons ou leur neutralisation par l'entrée d'ions bicarbonates. Ces mécanismes sont alors responsables d'une alcalinisation intracellulaire et d'une acidification extracellulaire.

Le mécanisme par lequel ce gradient inverse de pH apparaît dans les cellules cancéreuses n'est pas totalement élucidé. Il a été observé que la transformation de cellules non-cancéreuses par l'expression d'oncogènes induit une augmentation du pH intracellulaire (Hagag *et al.*, 1987; Kaplan and Boron, 1994; Ober and Pardee, 1987; Siczkowski *et al.*, 1994). Ces études démontrent une relation entre transformation et régulation du pH mais le rôle du pH dans les phénomènes de transformation n'est pas clairement établi : s'agit-il d'une étape de la transformation ou une conséquence de cette transformation ? L'étude du déroulement des étapes de la transformation dans un modèle d'expression d'un oncogène inductible a permis de démontrer que l'alcalinisation intracellulaire était un événement précoce de la transformation cellulaire (Reshkin *et al.*, 2000b). Dans ce modèle, l'inhibition de l'alcalinisation intracellulaire induite par la transformation empêche l'apparition d'un phénotype de transformation en inhibant l'augmentation de la prolifération cellulaire, la croissance indépendante du sérum, la croissance indépendante de l'adhésion, et le métabolisme glycolytique.

Il existe à la fois un gradient de pH au sein de la tumeur mais aussi au niveau d'une cellule unique observée *in vitro*. Plus la distance avec la circulation sanguine augmente, plus le pH de l'environnement tumoral diminue ce qui correspond aux zones hypoxiques de la tumeur (Figure 6) (Helmlinger *et al.*, 1997). De plus, un gradient de pH est observé dans des cellules

en migration et est nécessaire à leur déplacement. En effet, le pH extracellulaire est plus faible au niveau du bord avant qu'à l'arrière des cellules (Stock *et al.*, 2007; Stuwe *et al.*, 2007). Réciproquement le pH intracellulaire est plus alcalin au niveau du bord avant des cellules (Martin *et al.*, 2011). Ces études ont été confirmées par l'observation de l'absence de gradient de pH extracellulaire lorsque le glycocalyx, recouvrant les cellules est détruit (Krahling *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le gradient de pH établit dans l'environnement extracellulaire à la surface des cellules grâce au glycocalyx est nécessaire à la migration des cellules cancéreuses. Il a également été observé un pH_i plus alcalin dans les invadopodes comparé au reste du cytoplasme, ce gradient étant nécessaire à la maturation des invadopodes (Magalhaes *et al.*, 2011). L'observation de ces gradients de pH dans les tumeurs et dans les cellules cancéreuses met en évidence une régulation fine de l'efflux de protons dans les cellules cancéreuses et l'existence de micro-domaines de pH associés à des fonctions précises telles que la migration ou l'invasivité.

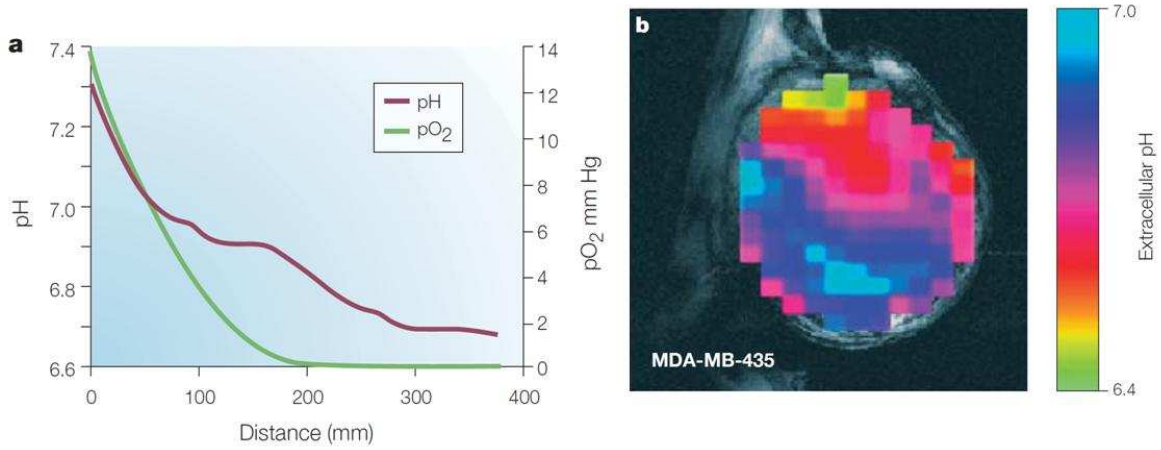


Figure 6 : Gradient de pH extracellulaire dans les tumeurs.

A. Le pH extracellulaire diminue lorsque la distance des vaisseaux sanguins augmente, la même relation est observée pour la pression partielle en oxygène (pO_2). B. Gradient de pH dans une tumeur. d'après Gatenby and Gillies, 2004.

Bien que l'effet des protons sur l'activité de nombreuses protéines, et particulièrement les enzymes, soit bien connu, le concept de « senseurs de pH » a récemment émergé (Casey *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2007; Tresguerres *et al.*, 2010). Plusieurs systèmes ont été mis en évidence comme des récepteurs couplés aux protéines G ayant une activité modifiée par des variations de pH extracellulaire (pH senseur) tels que OGR1 (ovarian cancer G-protein-coupled receptor) et GPR4 (G-protein coupled receptor 4) (Ludwig *et al.*, 2003) ou des canaux sensibles aux protons ASIC (Acid-sensing ion channels) (Wang and Xu, 2011). De

tels systèmes permettraient aux cellules cancéreuses de s'adapter aux variations de pH et de développer des voies de signalisation et des mécanismes leur permettant de survivre aux changements de pH intracellulaire et extracellulaire. Un de ces mécanismes est l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE1) par les protons intracellulaires permettant à l'échangeur d'expulser les protons en excès lors d'une acidification intracellulaire (Aronson *et al.*, 1982; Paris and Pouyssegur, 1984). Certaines protéines sensibles au pH sont impliquées dans diverses propriétés des cellules cancéreuses telles que Bax dans l'apoptose (Khaled *et al*., 1999), la cofiline dans la migration cellulaire (Frantz *et al*., 2008) ou la phosphofructokinase 1 (PFK1) dans le métabolisme glycolytique (Trivedi and Danforth, 1966).

B. Rôle du pH des cellules cancéreuses

Le milieu intracellulaire alcalin et l'environnement extracellulaire acide des cellules cancéreuses sont favorables à la croissance tumorale et au développement de métastases par de nombreux mécanismes.

1. Rôle du pH intracellulaire

La démonstration du rôle du pH intracellulaire dans la prolifération cellulaire a été faite lors d'une acidification intracellulaire de 7,1 à 4,8. Suite à cette acidification intracellulaire, moins de 0,1 % des cellules survivent après 30 minutes (Pouyssegur *et al.*, 1984). Ces études ont été précisées dans des cellules cancéreuses où un pH_i inférieur à 6, diminue la survie des cellules (Rotin *et al.*, 1987). Ceci démontrant l'effet toxique d'un pH intracellulaire acide. Le pH intracellulaire alcalin des cellules cancéreuses est donc favorable à leur prolifération et à leur survie en réduisant l'apoptose associée à l'acidification intracellulaire (Lagadic-Gossmann *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2000). L'alcalinisation intracellulaire favorise également la glycolyse en augmentant l'activité d'enzymes de la glycolyse et de la néoglucogenèse (Dietl *et al.*, 2010; Kuwata *et al.*, 1991; Peak *et al.*, 1992). Le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses produit une grande quantité d'acides (lactiques et carboniques) capables d'augmenter la glycolyse et donc d'aboutir à une boucle stimulant la glycolyse pour produire encore plus de protons. La cofiline, protéine jouant un rôle dans la dynamique de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine, présente une activité augmentée à pH_i

alcalin (Frantz *et al.*, 2008). Une autre protéine de liaison à l'actine et régulatrice de la formation des filaments d'actine, la gelsoline, présente une activité augmentée à pH_i acide (Lamb *et al.*, 1993). L'observation d'un gradient de pH intracellulaire dans les cellules cancéreuses a permis de proposer que les protéines de liaison à l'actine actives à pH alcalin (telles que la cofiline), régulent la polymérisation de l'actine au bord avant des cellules et que celles qui sont actives à pH acide (telles que la gelsoline) régulent le recyclage de l'actine à l'arrière des cellules. Ceci participerait ainsi à la migration des cellules cancéreuses (Stock and Schwab, 2009). De plus, il a été montré que l'activation de la petite GTPase CDC42, par la fixation de GTP par une GEF (guanine nucleotide exchange factor) est un mécanisme dépendant d'un pH intracellulaire alcalin et que cette activation est nécessaire à la polarité et à la migration cellulaire (Frantz *et al.*, 2007).

2. Rôle du pH extracellulaire dans la progression cancéreuse

Le microenvironnement extracellulaire acide des cellules cancéreuses est connu pour favoriser la progression tumorale et les propriétés d'invasivité des cellules cancéreuses.

Les mécanismes par lesquels le pH extracellulaire favorise le développement des tumeurs sont variés. Un pH extracellulaire acide induit une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques (Morita *et al.*, 1992). Il est également démontré que l'hypoxie et un environnement extracellulaire acide diminuent les mécanismes de réparation de l'ADN et augmentent le nombre de mutations (Kondo *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2000). Le pH acide de l'environnement tumoral est également capable de favoriser l'angiogenèse permettant ainsi la formation d'une néo-vascularisation tumorale nécessaire à l'alimentation de la tumeur en nutriments et constituant une des étapes importantes de la progression tumorale vers des stades avancés. Une diminution du pH extracellulaire induit une augmentation de l'expression du VEGF des cellules endothéliales (D'Arcangelo *et al.*, 2000) et des cellules cancéreuses (Fukumura *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001). De nombreuses molécules anti-angiogéniques diminuent la sortie de protons des cellules et induisent une acidification intracellulaire (Orive *et al.*, 2003). L'acidité de l'environnement extracellulaire est capable de moduler l'activité de la réponse immunitaire afin de favoriser la croissance de la tumeur (Kellum *et al.*, 2004; Lardner, 2001). L'acide lactique produit par les cellules cancéreuses inhibe l'activité cytolytique des lymphocytes T (Fischer *et al.*, 2007). Un pH extracellulaire acide diminue la cytotoxicité des lymphocytes NK (natural killer) (Fischer *et al.*, 2000; Loeffler *et al.*, 1991; Severin *et al.*, 1994). Une diminution du pH extracellulaire réduit la sécrétion de molécules

inflammatoires telles que le TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) (Heming *et al*., 2001) ou la production de NO (Nitric oxide) (Huang *et al*., 2002).

Certains effets du pH extracellulaire pourraient être dus à une action sur des facteurs de transcription permettant de modifier l'expression de gènes spécifiques. Parmi les protéines dont l'expression est augmentée par un pH extracellulaire acide, se trouvent notamment des protéases : MMP2, MMP9, MMP11 et les cathepsines B et L (Bumke *et al*., 2003; Rofstad *et al*., 2006), des facteurs pro-angiogéniques (VEGF et IL-8) (Rofstad *et al.*, 2006) ou des molécules inflammatoires telles que le TNF-α et iNOS (nitric oxide synthase inductible) (Heming *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). Les facteurs de transcription NFκB et AP1 semblent être impliqués dans l'augmentation de l'expression des gènes codants pour ces protéines (Bellocq *et al*., 1998; Kato *et al*., 2005; Xu and Fidler, 2000; Xu *et al*., 2002). D'autres facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la réponse à un environnement acide (Duggan *et al*., 2006; Shimokawa *et al*., 2006).

En plus de ces effets sur les mutations, la vascularisation ou le système immunitaire, l'environnement tumoral acide favorise le développement des métastases par de nombreux mécanismes. L'implication du microenvironnement acide dans l'invasivité des cellules cancéreuses a d'abord été démontré dans des systèmes *in vitro* (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1996) où une diminution du pH extracellulaire augmente la migration et l'invasivité de cellules cancéreuses. L'influence du pH extracellulaire sur la formation des métastases a également été démontrée *in vivo* dans un modèle de xénogreffe orthotopique chez la souris : la culture préalable de cellules de mélanomes dans un environnement acide *in vitro* augmente la formation de métastases pulmonaires lorsqu'elles sont transplantées dans des souris (Rofstad *et al.*, 2006). Dans ce modèle, la culture de cellules à un pH de 6,8 augmente la sécrétion d'enzymes protéolytiques (MMP2, MMP9, cathepsine B et cathepsine L) et de facteurs pro-angiogéniques (VEGF et IL-8) (Rofstad *et al.*, 2006). Une récente étude suggère que l'acidité du milieu extracellulaire permettrait de sélectionner des cellules résistantes à cet environnement délétère et qu'elles seraient plus invasives, conséquence de l'augmentation de l'expression de gènes nécessaires à ce phénotype invasif. Les cellules ainsi sélectionnées maintiennent leur potentiel invasif lorsque qu'elles sont de nouveau cultivées dans un milieu au pH physiologique (Moellering *et al.*, 2008). De plus, des analyses de modélisations informatiques ainsi que des expérimentations *in vivo* ont démontré que l'utilisation de tampons tels que le tampon bicarbonate permet d'augmenter le pH extracellulaire des tumeurs et de diminuer la formation des métastases (Robey *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

Le pH extracellulaire a de nombreux effets sur les cellules cancéreuses favorisant ainsi la formation des métastases (Cardone *et al.*, 2005b; Huber *et al.*, 2010; Parks *et al.*, 2011; Stock and Schwab, 2009; Webb *et al.*, 2011) :

- ✓ Par la modulation de l'adhésion cellulaire : la fixation d'intégrines à leurs ligands est dépendante du pH extracellulaire (Eble and Tuckwell, 2003; Lehenkari and Horton, 1999), l'adhésion de cellules de mélanome à une matrice extracellulaire est dépendante du pH du milieu extracellulaire avec un maximum entre 6,6 et 6,8 (Krahling *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2005).

- ✓ L'acidité extracellulaire est toxique pour des cellules normales (Park *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999). Ceci pourrait détruire les cellules non cancéreuses situées à proximité de la tumeur alors que les cellules cancéreuses possèdent des mécanismes de régulation du pH plus actifs.

- ✓ Un environnement extracellulaire acide induit la formation de protrusions cellulaires nécessaires à l'invasivité des cellules. La formation de pseudopodes et de lamellipodes est augmentée lorsque le pH extracellulaire diminue (Glunde *et al.*, 2003; Stock *et al.*, 2005). Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'acidification extracellulaire de 7,4 à 6,8 augmente la formation d'invadopodes et la dégradation de la matrice extracellulaire associée (Busco *et al*., 2010).

- ✓ Un pH acide augmente l'expression et la sécrétion d'enzymes protéolytiques dégradant la matrice extracellulaire. L'acidité du pH extracellulaire augmente l'expression de la MMP9 (Kato *et al.*, 2005) et de la MMP2 (Nishisho *et al.*, 2011). Un pH extracellulaire acide induit le déplacement des lysosomes contenant la cathepsine B vers la périphérie cellulaire stimulant ainsi la sécrétion de cathepsines B (Glunde *et al.*, 2003; Rozhin *et al.*, 1994; Steffan *et al.*, 2009).

- ✓ Le pH extracellulaire acide induit l'activation de cathepsines à cystéine, connues pour avoir une activité maximale à pH acide (Barrett and Kirschke, 1981). Ces protéases en plus de leur rôle de dégradation de la matrice extracellulaire peuvent activer d'autres protéases et induire une cascade d'activations protéolytiques (Guo *et al.*, 2002; Liaudet-Coopman *et al.*, 2006). De même, l'augmentation d'expression de la MMP2 et de la MMP9 par un milieu extracellulaire acide peut activer une cascade d'activations protéolytiques (Kessenbrock *et al.*, 2010; Mason and Joyce, 2011). La

cathepsine B est également capable d'induire la dégradation d'inhibiteurs endogènes de MMP, les TIMP (Kostoulas *et al.*, 1999).

Il semblerait qu'il existe un pH extracellulaire optimal, autour de 7 permettant une migration maximale des cellules de mélanome. Lorsque le pH extracellulaire descend en dessous de 7, la migration cellulaire diminue (Stock *et al.*, 2005; Stuwe *et al.*, 2007). De même, des analyses informatiques prédisent que l'invasivité des cellules cancéreuses n'augmente pas linéairement avec l'acidité du milieu extracellulaire, il existe un pH extracellulaire optimal capable de détruire les cellules stromales et de stimuler la dégradation de la matrice extracellulaire (Martin *et al.*, 2010). Dans ce modèle, les auteurs suggèrent, contrairement à ce qui est généralement admis, qu'augmenter l'acidité des tumeurs pourrait être une stratégie pour limiter l'invasivité des cancers.

C. Régulateurs du pH cellulaire

Le gradient de pH entre milieu intracellulaire et extracellulaire des cellules cancéreuses est établi grâce à la participation de protéines régulatrices capables d'expulser des protons (H^+) vers le milieu extracellulaire ou de faire entrer des ions bicarbonates (HCO_3^-). Plusieurs protéines régulatrices du pH présentent une expression (souvent modulée par le facteur de transcription HIF-1) ou une activité augmentée dans les cellules cancéreuses. Bien que la plupart des effets biologiques de ces protéines soient attribués à leur régulation du pH intracellulaire et extracellulaire, certaines d'entre elles semblent posséder des rôles qui leurs sont propres du fait de leur localisation subcellulaire ou de la présence dans leur séquence de motifs spécifiques. Les moyens mis en place par les cellules cancéreuses pour réguler leur pH intracellulaire et extracellulaire sont variés et dépendent du type cellulaire (Figure 7). Des mécanismes distincts peuvent également être mis en place dans des cellules possédant différents potentiels invasifs ou métastatiques (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1998; Montcourrier *et al.*, 1997). Il a été démontré une localisation subcellulaire différente des régulateurs de pH dans un modèle de tumeurs cérébrales (Grillon *et al.*, 2011).

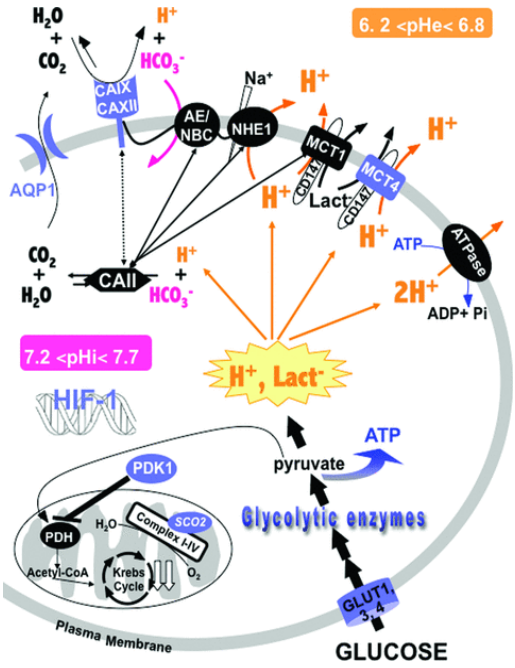


Figure 7 : Régulateurs du pH dans les cellules cancéreuses.

D'après Chiche *et al.*, 2010.

1. Echangeurs sodium-proton (NHE)

a) Structure et fonctionnement

Les échangeurs sodium-proton jouent un rôle majeur dans la régulation du pH intracellulaire. Ces échangeurs Na^+/H^+ (NHE) permettent l'échange électroneutre d'un Na^+ pour un H^+. Une stœchiométrie 2:2 a également été proposée (Fuster *et al.*, 2008). Cette famille comprend neuf isoformes (NHE1 à NHE9) possédant des distributions subcellulaires et tissulaires variées. Une dixième isoforme a été récemment décrite pour être exprimée dans les ostéoclastes où, bien qu'elle ne semble pas réguler leur pH intracellulaire, elle pourrait être associée à la différenciation et à la survie des ostéoclastes (Lee *et al.*, 2008). Les 9 isoformes de NHE fonctionnellement caractérisées sont codées par 9 gènes différents de la famille *SLC9A* (Solute carrier, regroupe les protéines membranaires facilitant le transport de substrats solubles) comprenant les membres *SLC9A1* à *SLC9A9*. Parmi les membres de cette famille, les isoformes NHE1 à NHE5 sont situées au niveau de la membrane plasmique alors que les membres NHE6 à NHE9 sont situés dans des organelles intracellulaires (Slepkov *et al.*, 2007). L'isoforme NHE1, ubiquitaire et la mieux décrite, a été clonée en 1989 par le groupe du Dr. Pouysségur (Sardet *et al.*, 1989). Les autres isoformes situées au niveau de la membrane plasmique possèdent des distributions tissulaires plus limitées. NHE2 et NHE3

sont situées dans les membranes apicales des cellules épithéliales, principalement dans le muscle squelettique, le colon et le rein pour NHE2 (Malakooti *et al.*, 1999), et le colon, l'intestin, l'estomac et le rein pour NHE3 (Orlowski *et al.*, 1992). NHE4 a été identifiée en même temps que NHE3 et se situe essentiellement au niveau de l'estomac (Orlowski *et al.*, 1992). NHE5 est exprimée au niveau du cerveau (Baird *et al.*, 1999). Les isoformes NHE6 à NHE9 semblent être exprimées de manière ubiquitaire et sont localisées dans les compartiments intracellulaires où elles permettent de réguler le pH de ces vésicules : NHE6 dans les endosomes précoces, NHE7 dans le trans-Golgi, NHE8 dans le mid et trans-Golgi et NHE9 dans les endosomes tardifs (Nakamura *et al.*, 2005). Toutes ces isoformes sont composées de 581 à 896 acides aminés avec une masse moléculaire comprises entre 74 et 93 kDa (Orlowski and Grinstein, 2004; Slepkov *et al.*, 2007). Elles possèdent une structure commune de 12 segments transmembranaires conservés et d'un domaine C-terminal intracellulaire plus variable contenant de nombreux sites de régulation par phosphorylations ou interactions protéiques (Figure 8) (Orlowski and Grinstein, 2004).

Peu de choses sont connues concernant la structure et le mécanisme de transport d'ions par les échangeurs sodium-proton, la structure de NHE1 étant la mieux décrite bien qu'encore incomplète (Slepkov *et al.*, 2007). NHE1 est composée de 815 acides aminés répartis en 2 domaines, un domaine membranaire permettant le transport des ions et contenant le site responsable de l'activation par les protons intracellulaires et un domaine cytosolique constitué de la boucle C-terminale permettant la régulation de l'activité de l'échangeur (Figure 8) (Wakabayashi *et al.*, 1992). Ces deux domaines sont indépendants, un mutant dépourvu de la boucle C-terminale est fonctionnel pour le transport d'ions (Wakabayashi *et al.*, 1992).

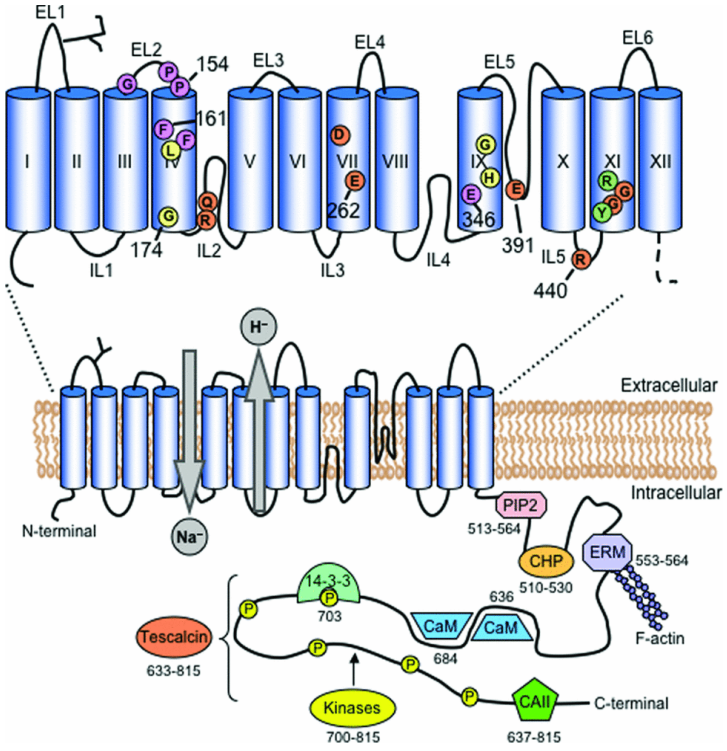


Figure 8 : Modèle de la structure et des sites de régulation de NHE1.

D'après Slepkov *et al.*, 2007.

De nombreuses études ont permis d'identifier certains éléments structuraux de NHE1. L'actualisation de la topologie de NHE1 a confirmé la structure comprenant 12 segments transmembranaires (TMI à TMXII) et des domaines N- et C-terminaux intracellulaires (Wakabayashi *et al.*, 2000a). Cette étude a permis d'identifier deux boucles intracellulaires, IL2 (intracellular loop) (entre TMIV et TMV) et IL4 (entre TMVIII et TMIX) importantes pour la fonction de l'échangeur, et propose une boucle entre TMIX et TMX entrant dans la membrane lipidique (Wakabayashi *et al.*, 2000a). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer l'implication des différentes structures impliquées dans la fonction de NHE1. Des résidus du segment TMVII semblent nécessaires à l'activité d'échange d'ions de NHE1 (Murtazina *et al.*, 2001). Les segments TMIV et TMIX ainsi que la boucle entre TMIII et TMIV semblent impliqués dans la sensibilité aux inhibiteurs pharmacologiques (Counillon *et al.*, 1997; Khadilkar *et al.*, 2001). Des résidus du segment TMIV semblent également impliqués dans l'affinité pour le sodium (Counillon *et al.*, 1997; Touret *et al.*, 2001) et dans l'adressage membranaire de NHE1 (Slepkov *et al.*, 2004). Le segment TMXI permet aussi l'adressage de NHE1 à la membrane plasmique (Wakabayashi *et al.*, 2000b). Ce même segment TMXI ainsi que les boucles IL2, IL4 et IL5 sont impliqués dans la sensibilité de

l'échangeur pour les protons intracellulaires et permettent la régulation allostérique de l'activité de l'échangeur par les protons intracellulaires (Lacroix *et al*., 2004; Wakabayashi *et al*., 2003). L'étude de la structure du segment TMIV (Slepkov *et al.*, 2005) ainsi que la résolution de la structure par cristallographie de l'échangeur sodium-proton bactérien NhaA (Hunte *et al.*, 2005) ont permis de proposer un nouveau modèle pour la structure de NHE1 qui comprendrait 12 segments transmembranaires dénommés TM1 à TM12 (Figure 9) (Landau *et al.*, 2007; Nygaard *et al.*, 2010). La nomenclature de ces segments ne se superpose pas et fait apparaît probablement deux segments supplémentaires. Les segments indiqués en chiffres romains se rapportent à l'ancien modèle et les segments indiqués en chiffre arabes correspondent au nouveau modèle.

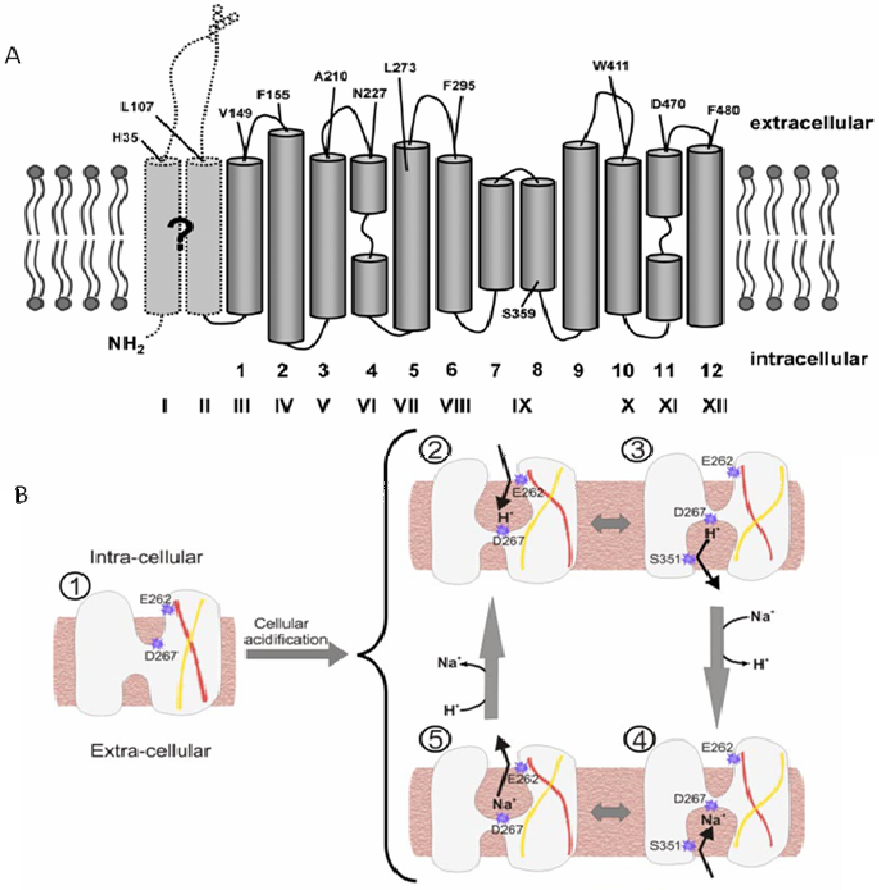


Figure 9 : Nouveau modèle et fonctionnement de NHE1.

A. La numérotation des segments du nouveau modèle de structure de NHE1 (Landau *et al.*, 2007) est indiquée en chiffres arabes et peut être comparée au modèle décrit par Wakabayashi en chiffres romains (Wakabayashi *et al.*, 2000a) d'après Lee *et al*., 2011. B. Fonctionnement de l'échangeur NHE1. Un proton entre dans la cavité intracellulaire où il se fixe (2), un changement de conformation permet d'orienter le proton vers le milieu extracellulaire (3) où il est échangé par un ion sodium (4). Un nouveau changement de conformation permet de libérer le sodium dans le milieu intracellulaire (5). d'après Landau *et al.*, 2007.

Les auteurs de ce dernier modèle proposent un mécanisme d'échange où le passage des ions se fait par deux entonnoirs comprenant les segments TM2, TM4, TM5 et TM9 pour la partie cytoplasmique et TM2, TM8 et TM11 pour la partie extracellulaire (Figure 9). Lors de l'acidification intracellulaire, un proton entre dans l'entonnoir cytoplasmique et se fixe à un résidu du TM5 (D267), un changement de conformation oriente le proton vers la face extracellulaire. Le sodium entre en compétition avec le proton, sa fixation induit le retour à la conformation initiale et permet de l'exposer vers le cytoplasme ou il est libéré et remplacé par un proton (Landau *et al.*, 2007).

Les différentes isoformes de NHE catalysent l'échange d'un proton intracellulaire à l'aide du gradient de sodium et possèdent différentes affinités pour le Na^+, Li^+, K^+ et H^+ (Masereel *et al.*, 2003). La constante d'affinité pour le Na^+ extracellulaire est comprise entre 5 et 10 mM et ces isoformes ont une dépendance pour le Na^+ extracellulaire qui suit une courbe de type Michaelis-Menten. Le Li^+ et le H^+ extracellulaire inhibent de manière compétitive l'entrée de sodium en interagissant avec le site de fixation du sodium extracellulaire (Masereel *et al.*, 2003). Contrairement au sodium extracellulaire, les protons intracellulaires activent de manière allostérique l'activité des échangeurs sodium-proton (Aronson *et al.*, 1982; Paris and Pouyssegur, 1984). Ces échangeurs sont relativement quiescents à pH neutre et s'activent lors d'une acidification intracellulaire. Ils possèdent en effet un rôle de protection contre l'acidification intracellulaire et permettent, en expulsant les protons en excès, un retour vers un pH intracellulaire compatible avec la survie des cellules. Des cellules déficientes pour NHE1 sont incapables de réguler leur pH intracellulaire à la suite d'une acidification intracellulaire (Pouyssegur *et al.*, 1984) (Figure 10).

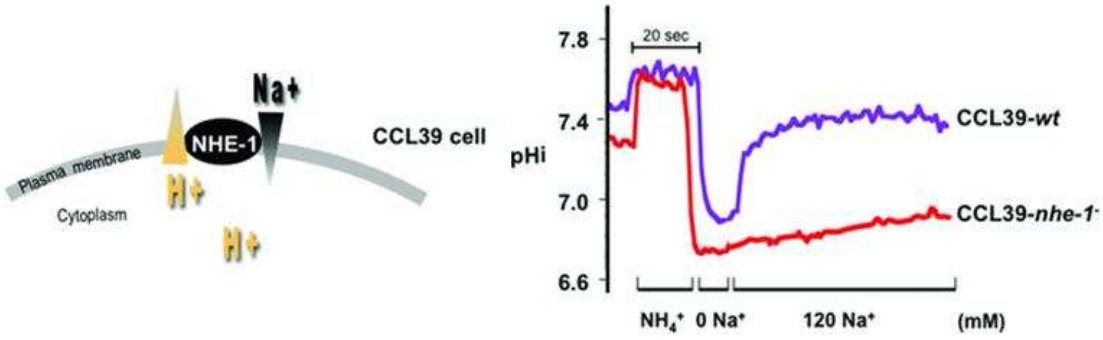


Figure 10 : Fonctionnement de l'échangeur sodium-proton NHE1.

Suite à une acidification intracellulaire (pulse $NH4^+$), l'échangeur NHE1 utilise les Na^+ extracellulaires pour faire sortir les H^+ intracellulaires et faire revenir le pH intracellulaire aux valeurs initiales (CCL39 wt). Des cellules mutantes ne possédant par d'échangeur NHE1 fonctionnel ($CCL39^-nhe1^-$) sont incapables de réguler leur pH intracellulaire suite à cette acidification. D'après Chiche *et al.*, 2010.

L'analyse de différentes mutations de l'isoforme NHE1 a permis de proposer un modèle permettant d'expliquer l'activation de l'échangeur par l'acidification intracellulaire (Lacroix *et al.*, 2004). Le modèle proposé utilise l'équation de Monod-Wyman-Changeux (pour un échangeur dimérique) pour décrire l'activation par les protons et ne nécessite pas la présence d'un site senseur de protons sur la protéine en plus du site permettant le transport de protons. Ce modèle explique l'activation de l'échangeur par une oscillation entre une conformation de faible affinité pour les protons intracellulaires vers une conformation de forte affinité lors de l'acidification. Un équilibre en faveur de la forme de faible affinité explique la faible activité de l'échangeur à pH physiologique (Lacroix *et al.*, 2004). De plus, l'échangeur NHE1 parait former des homodimères dans des cellules natives. Cependant cette dimérisation n'est pas requise pour l'activité de transport d'ions de l'échangeur, les monomères peuvent fonctionner indépendamment (Fafournoux *et al.*, 1994; Fliegel *et al.*, 1993). Les parties proximales du domaine C-terminal sont capables d'interagir entre elles et sont impliquées dans cette dimérisation (Hisamitsu *et al.*, 2004).

La forme mature de NHE1, exprimée au niveau de la membrane plasmique, est N- et O-glycosylée au niveau de la première boucle extracellulaire TMI et TMII lui conférant une masse moléculaire de 110 kDa (Counillon *et al.*, 1994). La forme immature présente dans le réticulum endoplasmique contient seulement une N-glycosylation et est d'une masse moléculaire de 85 kDa (Counillon *et al.*, 1994). Les N-glycosylations ne sont pas nécessaires pour l'activité d'échange d'ions et ne modifient pas les propriétés pharmacologiques de l'échangeur (Counillon *et al.*, 1994).

b) Pharmacologie, régulations et rôles physiologiques

En plus de régulations transcriptionnelles de l'expression de NHE1 par l'ischémie (Dyck *et al.*, 1995) ou par des hormones (Slepkov and Fliegel, 2004), l'activité de l'échangeur peut être modulée par des inhibiteurs pharmacologiques, par les propriétés biophysiques de la membrane, par des phosphorylations ou par des interactions protéiques sur le domaine C-terminal cytosolique (Figure 8).

Pharmacologie des échangeurs sodium-proton

Plusieurs molécules pharmacologiques sont capables d'inhiber les échangeurs sodium-proton. Ces molécules font partie de la famille de l'amiloride (un agent diurétique), dont l'EIPA (5-N-ethyl-N-isopropyl amiloride) et de celle des benzoylguanidine tel que le cariporide. Les échangeurs sodium-proton présentent différentes sensibilités à ces inhibiteurs. Parmi les échangeurs situés sur la membrane plasmique, NHE1 et NHE2 sont les isoformes les plus sensibles à l'amiloride ou à ses dérivés tandis que NHE3 et NHE4 sont les plus résistantes, NHE5 présentant une sensibilité intermédiaire (Tableau I) (Masereel *et al.*, 2003). Plusieurs dérivés de l'amiloride ont été développés afin d'inhiber sélectivement les échangeurs sodium-proton puisque l'amiloride inhibe également des canaux sodiques et les échangeurs sodium-calcium. NHE1 est l'isoforme la plus sensible à ces dérivés mais d'autres isoformes peuvent être inhibées. Le cariporide et ses dérivés sont les composés présentant une plus grande sélectivité entre les isoformes de NHE permettant d'inhiber plus spécifiquement NHE1 (Masereel *et al.*, 2003). Le mode d'action de ces composés et leur site de fixation sont peu connus. Plusieurs études contradictoires ne permettent pas de mettre en évidence s'il s'agit d'une inhibition compétitive ou non compétitive et de déterminer si la fixation de l'inhibiteur se fait sur le même site que celui permettant la fixation du sodium ou des protons (Ives *et al.*, 1983; Paris and Pouyssegur, 1983). En revanche plusieurs études ont mis en évidence que des résidus des segments TMIV et TMIX sont impliqués à la fois dans le transport d'ions mais aussi dans la sensibilité aux inhibiteurs pharmacologiques (Counillon *et al.*, 1997; Khadilkar *et al.*, 2001; Touret *et al.*, 2001).

		NHE1	NHE2	NHE3	NHE4	NHE5
amiloride	Ki	1-1,6	1,0	>100		21
	IC50	5,3		100-309	813	
EIPA	Ki	0,01-0,02	0,08-0,5	2,4		0,42
	IC50	25,1		3,3	>10	1,53
cariporide	IC50	0,03-3,4	4,3-62	1->100	545*	>30

Tableau I : Inhibition des échangeurs sodium-proton situés au niveau de la membrane plasmique par des inhibiteurs pharmacologiques (IC50 ou Ki en µM).

Valeurs tirées de Masereel *et al.*, 2003 * tiré de Chambrey *et al.*, 2001.

Régulation de l'activité de NHE1 par phosphorylations

Ces phosphorylations de l'échangeur se produisent en réponse à une diminution du pH intracellulaire, à des hormones ou à des facteurs de croissance et permettent d'augmenter l'activité de NHE1 (Haworth *et al.*, 2003; Sardet *et al.*, 1990; Sardet *et al.*, 1991). Ces phosphorylations modifient le plus souvent la sensibilité de NHE1 pour les protons intracellulaires, le rendant plus actif à des pH neutres. Des kinases de la famille des MAPK telles que ERK1/2 (Bianchini *et al.*, 1997; Snabaitis *et al.*, 2000) ne phosphorylent pas directement NHE1 mais en réponse à des facteurs de croissance, activent la kinase $p90^{RSK}$ (p90 ribosomal S6 kinase) qui phosphoryle NHE1 et permet de l'activer (Takahashi *et al.*, 1999). La phosphorylation de NHE1 par $p90^{RSK}$ conduit à la fixation de la protéine d'échafaudage 14-3-3 sur ce site (Lehoux *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 2006). NHE1 peut également être activée par la stimulation de récepteurs à activité tyrosine kinase de type EGF (Liaw *et al.*, 1998) ou PDGF (platelet-derived growth factor) (Di Sario *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1994). La kinase NIK (nck-interacting kinase) est capable d'activer NHE1 par phosphorylation lors d'une stimulation par le PDGF (Yan *et al.*, 2001). L'activation de la voie de la petite GTPase RhoA induit la phosphorylation de NHE1 par la kinase p160ROCK ce qui active l'échangeur (Tominaga *et al.*, 1998). Les intégrines sont capables d'activer NHE1 par la même voie impliquant RhoA et ainsi de moduler l'adhésion et la migration cellulaire (Tominaga and Barber, 1998). NHE1 est également phosphorylée par la CaMKII (Ca2+/calmodulin dépendant kinase II) (Fliegel *et al.*, 1992). Le rôle de P38 MAPK sur l'activité de NHE1 n'est pas clairement établi, il a été reporté une augmentation (Khaled *et al.*, 2001) ou une diminution (Kusuhara *et al.*, 1998) de l'activité de NHE1 par P38 MAPK.

Il a été observé une augmentation de l'activité de NHE1 par la fixation de l'anhydrase carbonique II (CAII) sur la partie C-terminale de NHE1 suite à la phosphorylation de la partie terminale de ce domaine (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Ce mécanisme pourrait expliquer l'activation de NHE1 par ces différentes kinases. L'anhydrase carbonique en catalysant la formation de protons, couplée à une sortie de HCO_3^- permettrait une augmentation locale de la concentration en protons à proximité de NHE1 et son activation. La démonstration de la régulation de NHE1 par des phosphorylations est appuyée par la mise en évidence du rôle de phosphatases capables de réduire l'activité de NHE1 (Sardet *et al.*, 1991) telles que les phosphoprotéines phosphatases 1 et 2A (Misik *et al.*, 2005; Snabaitis *et al.*, 2006).

Régulation de l'activité de NHE1 par des interactions protéiques

NHE1 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines qui permettent également de réguler son activité. Plusieurs protéines de fixation du calcium ont été identifiées comme interagissant avec NHE1. La calmoduline se fixe sur la partie C-terminale de NHE1 au niveau de deux sites, un de haute affinité et un de faible affinité (Bertrand *et al.*, 1994). Le site de haute affinité régule NHE1 comme un domaine d'auto-inhibition, la fixation du complexe calcium-calmoduline sur ce domaine lève l'inhibition de l'échangeur (Wakabayashi *et al.*, 1994). La récente cristallisation du domaine C-terminal de NHE1 en interaction avec le complexe calcium-calmoduline a permis de proposer un modèle dans lequel les charges positives du site de haute affinité pour la calmoduline se fixent à des charges négatives de la partie transmembranaire pour inhiber l'activité de NHE1. En présence de calcium et de calmoduline, leur fixation sur ce domaine libère la partie transmembranaire de NHE1 et lève l'inhibition de son activité (Koster *et al.*, 2011). La protéine CHP1 (calcineurin homologous protein 1) se fixe sur le domaine C-terminal de NHE1 avec deux ions calcium et cette fixation est nécessaire à la sensibilité de NHE1 pour les protons intracellulaires (Pang *et al.*, 2004). La protéine CHP2 interagit également avec NHE1 permettant d'augmenter son activité (Pang *et al.*, 2002). Enfin, la tescalcin, une autre protéine de liaison au calcium se fixe sur NHE1 et diminue son activité (Li *et al.*, 2003). Le phospholipide PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) impliqué dans la signalisation cellulaire, se fixe sur le domaine C-terminal de NHE1 et augmente son activité (Aharonovitz *et al.*, 2000). Il a également été démontré une interaction de NHE1 avec la protéine chaperonne HSP70 (heat shock protein) qui serait probablement impliquée dans le repliement de NHE1 (Silva *et al.*, 1995).

Une des propriétés importantes de NHE1 est sa liaison aux filaments d'actine par une interaction directe avec les protéines de liaison à l'actine de la famille ERM (ezrin, radixin, moesin) (Denker *et al.*, 2000). Cette fixation aux protéines ERM est nécessaire à l'adhésion et à la forme des cellules, et met en évidence pour NHE1 un rôle autre que celui d'échange d'ions. De par ses multiples interactions protéiques, il a été proposé que NHE1 soit une protéine membranaire d'échafaudage permettant la mise en place d'un complexe multi-protéique nécessaire à la signalisation cellulaire et à la régulation dynamique du cytosquelette (Baumgartner *et al.*, 2004).

Régulation de l'activité de NHE1 par les propriétés biophysiques de la membrane

Il a été démontré une régulation de NHE1 par son environnement lipidique. L'activité de NHE1 est augmentée lorsqu'il se situe en dehors de micro-domaines membranaires riches en cholestérol et en cavéoline-1, les radeaux lipidiques. Cette activation de NHE1 passe par une augmentation de son affinité pour les protons intracellulaires (Tekpli *et al.*, 2008).

Il est démontré que NHE1 participe à la régulation du volume cellulaire. La diminution du volume cellulaire induite par une hyperosmolarité augmente l'activité de NHE1 par une augmentation de son affinité pour les protons intracellulaires en modifiant la constante allostérique (Grinstein *et al.*, 1992; Lacroix *et al.*, 2008). Cette régulation de NHE1 par le volume cellulaire semble être indépendante du cytosquelette (Fuster *et al.*, 2004) et de la phosphorylation de l'échangeur par les kinases Erk, p38 MAPK and SAPK (Stress activated protein kinase) (Gillis *et al.*, 2001; Grinstein *et al.*, 1992). En revanche, bien que la quantité de phosphorylation de NHE1 ne soit pas modifiée lors d'un choc osmotique (Grinstein *et al.*, 1992), ce phénomène pourrait faire intervenir des déphosphorylations accompagnées de nouvelles phosphorylations ne modifiant pas la quantité de phosphorylation totale. La tyrosine kinase Janus kinase 2 (Jak2) semble être impliquée dans l'activation de NHE1 par une diminution du volume cellulaire (Garnovskaya *et al.*, 2003; Zhou and Baltz, 2012). Il a été proposé que NHE1 pourrait être sensible aux propriétés de courbure ou de tension de la membrane plasmique définissant ainsi NHE1 comme un transporteur mécano-sensible (Fuster *et al.*, 2004). L'agent anti-cancéreux cisplatine a été identifié comme un inhibiteur de canaux et échangeurs mécano-sensibles dont NHE1, ce qui pourrait expliquer certains de ses effets secondaires (Milosavljevic *et al.*, 2010). NHE1 serait plutôt sensible à l'asymétrie des deux feuillets de la bicouche lipidique qu'à la tension de la membrane (Pang *et al.*, 2012).

Rôles physiopathologiques de NHE1

NHE1 est impliqué dans de nombreuses propriétés cellulaires ce qui en fait un acteur majeur de la physiologie cellulaire (Fliegel, 2005; Malo and Fliegel, 2006; Orlowski and Grinstein, 2004; Pedersen, 2006; Putney *et al.*, 2002). En plus de son rôle dans la régulation du pH et du volume cellulaire (Rotin and Grinstein, 1989), l'échangeur NHE1 est impliqué dans la prolifération cellulaire (Grinstein *et al.*, 1989), l'apoptose (Huc *et al.*, 2007; Khaled *et al.*, 1999; Khaled *et al.*, 2001; Rebillard *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003) ou encore l'adhésion et la

migration cellulaire (Denker and Barber, 2002). Il peut également être impliqué dans la différenciation cellulaire (Rao *et al.*, 1992).

Le rôle de NHE1 dans plusieurs pathologies, notamment cardiaques, a été démontré. Lors d'une augmentation de la production de protons, NHE1 en régulant le pH induit une augmentation de la concentration en Na^+ qui est éliminée par l'inversion de l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} (NCX) conduisant à une entrée de calcium délétère dans les cellules (Allen and Xiao, 2003; Fliegel and Wang, 1997). Bien qu'un effet bénéfique sur le cœur de l'inhibition de NHE1 pendant l'ischémie et la reperfusion ait été démontré dans des modèles animaux (Gumina *et al.*, 1999; Spitznagel *et al.*, 2000), les essais cliniques chez l'Homme sont peu encourageants (Mentzer *et al.*, 2008).

c) Fonction dans les cellules cancéreuses

L'isoforme ubiquitaire NHE1 est la seule dont l'activité ait été associée à plusieurs propriétés des cellules cancéreuses (Cardone *et al.*, 2005b; Harguindey *et al.*, 2005; Stock and Schwab, 2009). Dans les cellules cancéreuses, l'expression et l'activité de NHE1 sont augmentées par divers phénomènes. L'expression de NHE1 peut être augmentée par l'hypoxie (Rios *et al.*, 2005) par un mécanisme impliquant HIF-1α et un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) sur le promoteur du gène codant pour NHE1 (Shimoda *et al.*, 2006). De plus, l'expression de NHE1 est plus importante dans les zones hypoxiques de carcinomes mammaires (Gatenby *et al.*, 2007). L'expression de NHE1 peut être régulée par des facteurs de transcription de la famille des PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor). Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'activation de PPARγ diminue l'expression de NHE1 via un élément de réponse aux PPAR (PPRE) sur le gène codant pour NHE1 et induit une diminution du pH intracellulaire (Kumar *et al.*, 2009). Cette régulation est observée chez des patients traités par un antidiabétique agoniste de PPAR. L'expression de NHE1 est diminuée dans les tumeurs de ces patients comparées aux tumeurs de patients traités par d'autres antidiabétiques non agoniste de PPAR ou aux tumeurs de patients non diabétiques (Kumar *et al.*, 2009). L'expression de NHE1 peut également être régulée par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'augmentation de l'expression de NHE1 par les ERO est impliquée dans des phénomènes de résistance à la mort cellulaire (Akram *et al.*, 2006).

Dans les cellules stimulées par les mitogènes, comme c'est le cas dans les cellules cancéreuses, une augmentation de l'affinité pour les protons intracellulaires par un mécanisme de coopération augmente l'activité de NHE1 (Lacroix *et al.*, 2004; Paris and Pouyssegur,

1984). Ce même mécanisme d'activation de NHE1 est retrouvé dans les gliomes par rapport aux tissus non cancéreux (McLean *et al.*, 2000) et lors d'une déplétion en sérum mimant les conditions de l'environnement tumoral qui n'est pas alimenté par les vaisseaux sanguins (prolifération indépendante des facteurs de croissance) (Reshkin *et al.*, 2000a). NHE1 peut être régulé au niveau post-traductionnel par la voie de signalisation activée par l'EGF (Chiang *et al.*, 2008). Il a également été démontré une régulation de NHE1 par son environnement lipidique, impliquant des interactions avec l'environnement extracellulaire (Bourguignon *et al*., 2004; Lacroix *et al.*, 2008; Tekpli *et al.*, 2008).

Le rôle de NHE1 dans la régulation du pH intracellulaire et la prolifération cellulaire a été démontré en utilisant les propriétés de réversibilité de l'échangeur. Lorsque l'échangeur est forcé à fonctionner dans le sens inverse c'est-à-dire en faisant entrer des protons, les cellules s'acidifient et meurent rapidement (Pouyssegur *et al.*, 1984). Cette technique a permis de sélectionner des mutants déficients pour NHE1 qui sont incapables de faire rentrer des protons et donc résistants à cette méthode (Pouyssegur *et al.*, 1984). Ces cellules déficientes pour NHE1 développent moins de tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes et lorsque des tumeurs se développent, présentent une croissance tumorale ralentie par rapport aux cellules exprimant NHE1 (Lagarde *et al.*, 1988). Des résultats identiques ont été obtenus avec des cellules cancéreuses de vessie déficientes pour NHE1 (Rotin *et al.*, 1989). De plus, des cellules doublement déficientes pour la respiration mitochondriale et l'expression de NHE1, présentant donc un métabolisme glycolytique, ne forment pas de tumeurs. Dans ces cellules les protons produits par la glycolyse ne peuvent pas être éliminés par NHE1 démontrant ainsi l'importance de l'activité de transport de protons par NHE1 dans le développement tumoral (Pouyssegur *et al.*, 2001).

Les cellules transformées par l'expression de différents oncogènes (Ras et E7) ont un pH intracellulaire plus alcalin dû à l'activation de NHE1 (Doppler *et al.*, 1987; Hagag *et al.*, 1987; Kaplan and Boron, 1994; Reshkin *et al.*, 2000b). La transformation induit un décalage de la courbe d'activation par les protons intracellulaires pour des valeurs moins acides induisant une activation de l'échangeur aux valeurs de pH intracellulaire des cellules cancéreuses. Ceci se traduit par l'alcalinisation du pH intracellulaire lors de la transformation (Kaplan and Boron, 1994; Reshkin *et al.*, 2000b). L'activation de NHE1 lors de la transformation cellulaire induit une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* (Reshkin *et al.*, 2000b). Réciproquement, l'inhibition de

l'expression de NHE1 par PPARγ diminue la prolifération cellulaire *in vitro* (Kumar *et al.*, 2009), de même pour l'inhibition de son activité par des inhibiteurs pharmacologiques (Horvat *et al.*, 1992). Des cellules déficientes pour l'expression de NHE1 présentent également une prolifération diminuée (Pouyssegur *et al.*, 1984). L'activité de NHE1 permet la transition de la phase G2 du cycle cellulaire vers la phase M par une régulation de l'expression de la cycline B1 et de l'activité des kinases cdc42 et Wee1, protéines régulatrices de la transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire (Putney and Barber, 2003). Il a été démontré que l'inhibition de NHE1 arrête le cycle cellulaire en phase G0/G1 (Wu *et al.*, 2006) en diminuant l'expression du facteur de transcription E2F1 (Yu and Hales, 2011). L'activité de NHE1 permettrait donc de favoriser l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. L'inhibition de NHE1 est également associée à une induction de l'apoptose (Rich *et al.*, 2000). Ces deux phénomènes, progression du cycle cellulaire et diminution de l'apoptose par l'activité de NHE1 permettent à cet échangeur de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses (et non cancéreuses). Récemment, NHE1 a été impliquée dans l'induction de l'angiogenèse par un mécanisme dépendant de HIF-1α (Mo *et al.*, 2011). L'activité de cet échangeur pourrait donc favoriser la croissance tumorale en induisant la formation de nouveaux vaisseaux.

En plus de son rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses, NHE1 participe à la migration cellulaire et à la dégradation de la matrice extracellulaire par ces cellules. NHE1 est exprimé au niveau du bord avant des cellules polarisées dans le sens du mouvement au niveau des lamellipodes (Klein *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2007). Il y est co-localisé avec la vinculin, la talin et la F-actin, protéines présentes dans le cytosquelette des cellules et impliquées dans l'établissement des contacts focaux (Grinstein *et al.*, 1993). NHE1 fait partie du complexe d'adhésion focal où il peut interagir avec les intégrines (Plopper *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1991). Cette polarisation de NHE1 dans les cellules cancéreuses permet par son activité d'efflux de protons l'établissement du gradient de pH intracellulaire et extracellulaire au sein des cellules (Martin *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2007; Stuwe *et al.*, 2007). L'activité focalisée de NHE1 et donc l'acidification de l'environnement extracellulaire est impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (Krahling *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2005; Stock *et al.*, 2007; Stuwe *et al.*, 2007). De plus, NHE1 présent dans les lamellipodes est associé aux protéines de liaisons à l'actine de la famille ezrin, radixin et moesin (ERM). Cette interaction est nécessaire à l'organisation du cytosquelette d'actine et des contacts focaux de ces cellules d'une manière indépendante de l'activité d'échange d'ions,

alors que la prolifération cellulaire en dépend (Denker *et al.*, 2000). L'activité d'échange d'ions ainsi que cette interaction avec les protéines ERM sont nécessaires à la polarité des cellules, à la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire (Denker and Barber, 2002). L'EGF induit une augmentation d'expression de NHE1 et sa localisation dans les lamellipodes où il interagit avec l'ezrin et participe à la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses (Chiang *et al.*, 2008). De plus, l'expression d'EGF dans des tumeurs est corrélée avec celle de NHE1 (Chiang *et al.*, 2008). Il a été précisé que l'EGF induit une augmentation d'activité de NHE1 dans les invadopodes et une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire dans ces structures (Busco *et al.*, 2010). NHE1 est également nécessaire à la réorganisation des filaments d'actine des fibres de stress en actine corticale induite par les facteurs de croissance (Meima *et al.*, 2009). L'activité d'efflux de protons de NHE1 permet d'activer la petite GTPase CDC42 qui est nécessaire à la polarité et à la migration cellulaire (Frantz *et al.*, 2007).

L'activation de NHE1 par une déplétion en sérum, mimant les conditions de l'environnement tumoral, augmente la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires (Reshkin *et al.*, 2000a). Cette déplétion en sérum induit une inhibition de la petite GTPase RhoA et une activation d'une autre petite protéine G, Rac1, activant NHE1 par une modification de l'affinité de l'échangeur pour les protons. Elle modifie la forme cellulaire en diminuant la quantité d'actine polymérisée et en augmentant la formation de pseudopodes ce qui stimule la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires (Paradiso *et al.*, 2004). L'inactivation de RhoA lors d'une déplétion en sérum induit une voie de signalisation impliquant ROCK (Rho-associated Kinase) et P38 MAPK pour activer NHE1 et favoriser l'invasivité cellulaire (Cardone *et al.*, 2005a). L'activité de NHE1 conduit à la formation de pseudopodes, où il est exprimé, et à une augmentation de l'invasivité dans plusieurs modèles de cellules cancéreuses (Iwasaki *et al.*, 2002; Lagana *et al.*, 2000; Paradiso *et al.*, 2004). L'observation de l'expression de NHE1 dans les pseudopodes et de son rôle dans l'invasivité conduit à émettre l'hypothèse que l'activité localisée de NHE1 dans ces domaines cellulaires pourrait stimuler le transport des lysosomes (contenant des protéases) et la sécrétion de protéases. En effet, un environnement extracellulaire acide induit le déplacement des lysosomes vers les pseudopodes de cellules cancéreuses (Glunde *et al.*, 2003).

En plus de sa localisation dans les lamellipodes et les pseudopodes des cellules cancéreuses, NHE1 a été retrouvée dans d'autres domaines membranaires. Dans les cellules cancéreuses

mammaires l'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire se fixe sur son récepteur CD44 situé dans les radeaux lipidiques induisant le recrutement de ROCK et de NHE1 dans ces zones membranaires. Ce rapprochement permet la phosphorylation de NHE1 par ROCK ce qui augmente l'activité de NHE1 (Bourguignon *et al.*, 2004). L'activation de NHE1 induit une acidification du pH extracellulaire, une augmentation de l'activité des cathepsines B et de l'invasivité cellulaire (Bourguignon *et al.*, 2004). NHE1 localisé dans les invadopodes induit une acidification extracellulaire permettant la dégradation de la matrice extracellulaire (Busco *et al.*, 2010). L'expression de NHE1 dans ces invadopodes est nécessaire à leur formation et à leur activité de dégradation de la matrice extracellulaire (Busco *et al.*, 2010). La formation des invadopodes implique la phosphorylation de la cortactine qui recrute NHE1 au niveau des précurseurs d'invadopodes. L'alcalinisation induite par NHE1 permet de détacher la cofiline de la cortactine et d'induire la polymérisation de l'actine permettant ainsi l'élongation des invadopodes (Magalhaes *et al.*, 2011).

L'étude du profil de transcription de cellules exprimant un échangeur NHE1 fonctionnel et d'autres exprimant un mutant ne permettant pas l'activité d'échange d'ions de NHE1 a permis de mettre en évidence le rôle du pH sur la régulation de la transcription de nombreux gènes (Putney and Barber, 2004). Parmi les gènes étudiés, 198 présentent une expression différente entre ces deux lignées cellulaires. Notamment le gène codant pour la MMP9 est diminué d'environ 26 fois dans les cellules ne présentant pas d'activité de NHE1 et ce résultat est confirmé par une diminution de son activité (Putney and Barber, 2004). Cette régulation de l'expression du gène codant pour MMP9 par l'activité de NHE1 pourrait participer à l'invasivité cellulaire. Cette étude à également mis en évidence une régulation de gènes codants pour des protéines du métabolisme énergétique en faveur des phosphorylations oxydatives pour les cellules ne possédant pas d'activité NHE1 (Putney and Barber, 2004). Il a été démontré que l'enzyme de la glycolyse, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), était localisée dans des pseudopodes où elle co-localise avec des zones riches en actine (Nguyen *et al.*, 2000). L'inhibition de la glycolyse induit une transformation des pseudopodes en lamellipodes et inhibe la migration cellulaire suggérant que la glycolyse produit l'énergie et les protons nécessaires à la migration et à l'invasivité directement dans les protrusions cellulaires (Nguyen *et al.*, 2000). De plus, il a été récemment démontré que plusieurs enzymes de la glycolyse étaient localisées dans les invadopodes de cellules cancéreuses (Attanasio *et al.*, 2011).

L'activité de NHE1 semble également impliquée dans les phénomènes de résistance aux anticancéreux. Les cellules résistantes aux agents de chimiothérapie ont généralement un pH cytoplasmique plus alcalin et des vésicules intracellulaires plus acides que des cellules sensibles à ces agents (Larsen *et al.*, 2000). Il a été démontré que l'expression et l'activité de NHE1 étaient augmentées dans des cellules résistantes à la doxorubicine et que l'inhibition de NHE1 par un inhibiteur pharmacologique permet de restaurer la sensibilité à cet agent anti-cancéreux (Miraglia *et al.*, 2005). L'inhibition de NHE1 est également impliquée dans l'action de certains agents anti-cancéreux induisant l'apoptose des cellules cancéreuses tels que le paclitaxel (Reshkin *et al.*, 2003) et le cisplatine (Rebillard *et al.*, 2007).

Dans les tumeur du col de l'utérus et les hépatocarcinomes, une surexpression de NHE1 est associée à un stade avancé et à un mauvais pronostic de survie (Chiang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de NHE1 sont toxiques dans des modèles de tumeurs murines (Luo and Tannock, 1994). Une étude clinique testant l'effet du cariporide dans l'infarctus du myocarde a révélé une augmentation du risque de mortalité rendant l'utilisation de cet inhibiteur impossible (Mentzer *et al.*, 2008). L'isoforme NHE1 étant ubiquitaire, l'utilisation d'inhibiteurs de NHE1 comme traitement anti-cancéreux nécessite de cibler les cellules cancéreuses afin de ne pas induire d'effets secondaires.

2. Pompe à protons de type vacuolaire (V-ATPase)

a) Structure

La pompe à protons de type vacuolaire (V-ATPase), initialement mise en évidence dans les organelles de cellules végétales ou fongiques, est également exprimée dans les cellules eucaryotes où elle est localisée dans les compartiments intracellulaires mais aussi au niveau de la membrane plasmique. Il s'agit d'un complexe multiprotéique utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour transporter de manière électrogénique les protons (Brown *et al.*, 1987; Forgac, 1989). Le complexe est séparé en deux domaines ; un domaine V1 composé de 8 sous-unités différentes (A-H) responsables de l'hydrolyse de l'ATP et un domaine V0 membranaire composé de 6 sous-unités (a, c, c', c'', d et e) formant le pore responsable du transport des protons (Figure 11) (Forgac, 2007; Jefferies *et al.*, 2008). Les sous-unités c, c' et c'' forment un anneau au niveau membranaire nécessaire à la fonction du complexe. Le transport des protons s'effectue par une rotation du complexe protéique (Hirata *et al.*, 2003;

Imamura *et al.*, 2003). L'hydrolyse de l'ATP par le domaine V1 fourni l'énergie nécessaire pour la rotation d'un complexe composé des sous-unités D F d et de l'anneau. L'anneau effectue sa rotation par-rapport à la sous-unité a fixe, composée de deux hémi-canaux un orienté vers le cytoplasme et l'autre vers le milieu extracellulaire ou luminal. Le proton rentre par l'hémi-canal situé sur la partie cytoplasmique et se fixe sur une des sous-unités de l'anneau, puis lors de la rotation reste attaché sur l'anneau pour atteindre l'autre hémi-canal. Ce transport s'effectue avec une stœchiométrie de deux protons pour l'hydrolyse d'un ATP puisque ce complexe possède six sites de fixation pour les protons au niveau de l'anneau et 3 sites d'hydrolyse d'ATP (Tomashek and Brusilow, 2000).

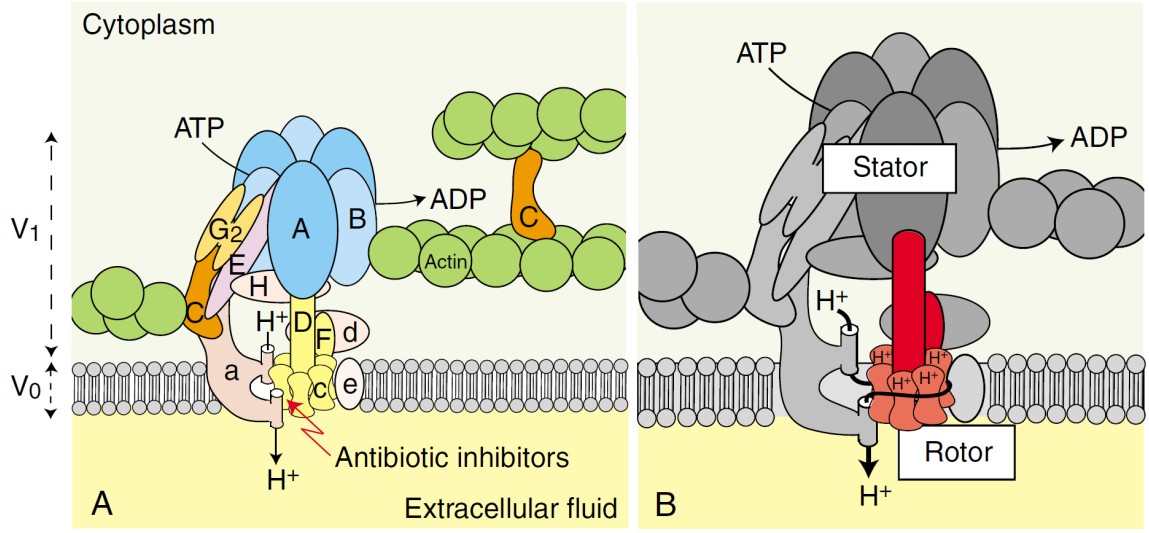


Figure 11 : Structure et fonctionnement de la V-ATPase

A. Structure des deux domaines V0 et V1 formant la V-ATPase. B. L'hydrolyse de l'ATP par le complexe V1 induit la rotation du rotor situé sur le complexe V0 et permettant le transport de protons. D'après Beyenbach and Wieczorek, 2006.

b) Fonction

Les V-ATPases situées dans les organelles intracellulaires telles que les vésicules à clathrine, les vésicules synaptiques, les endosomes, les vésicules de l'appareil de Golgi, les vésicules sécrétrices ou les lysosomes ont pour rôle l'acidification de ces compartiments et la génération d'une force proton-motrice. Ces protons situés dans les compartiments intracellulaires peuvent être utilisés pour transporter des molécules comme des neurotransmetteurs ou des acides aminés vers ces compartiments. Le milieu acide de certains

compartiments est nécessaire pour la dissociation de complexes récepteur-ligand intervenant dans les voies de l'endocytose ou pour l'activation d'enzymes protéolytiques capables d'activer par protéolyse d'autres protéines (Jefferies *et al.*, 2008). Les V-ATPases exprimées au niveau de la membrane plasmique sont principalement situées dans des cellules épithéliales où elles permettent d'acidifier l'environnement extracellulaire et de réguler le pH intracellulaire. Dans les ostéoclastes la V-ATPase sécrète des protons lors du phénomène de résorption osseuse afin de dissoudre l'os et d'activer des protéases (revue du paragraphe II.D) (Nordstrom *et al.*, 1995). L'activité de transport de protons par la V-ATPase peut être régulée par la formation de ponts disulfures réversibles au niveau des sites catalytiques (Feng and Forgac, 1992a,1992b). Sa régulation peut également s'effectuer par son adressage à la membrane, par dissociation des deux domaines V1 et V0 ou par une variation du couplage entre transport de protons et hydrolyse d'ATP (Cipriano *et al.*, 2008).

La V-ATPase est exprimée au niveau de la membrane plasmique de cellules cancéreuses où elle possède un rôle de régulation du pH intracellulaire (Martinez-Zaguilan and Gillies, 1992; Martinez-Zaguilan *et al.*, 1993) et par conséquent du pH extracellulaire. Son expression au niveau de la membrane plasmique et son activité sont retrouvées dans des cellules cancéreuses hautement invasives et il est proposé que son activité soit corrélée à l'agressivité des cellules cancéreuses (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1998; Sennoune *et al.*, 2004).

L'expression de la V-ATPase dans les cellules cancéreuses est impliquée dans plusieurs de leurs propriétés. L'inhibition de la V-ATPase diminue la prolifération (Manabe *et al.*, 1993), modifie la morphologie des cellules et diminue leur migration (Thomsen *et al.*, 1999). La surexpression de la V-ATPase dans des fibroblastes induit une augmentation de l'invasivité des cellules et de l'activité de la MMP2 (Kubota and Seyama, 2000). De plus l'expression de la V-ATPase est capable d'augmenter la tumorigénicité des cellules (Perona and Serrano, 1988) tandis que son inhibition par un siRNA réduit la taille des tumeurs et la formation des métastases (Lu *et al.*, 2005b). Il a été montré que les isoformes a3 et a4 du domaine V0 sont plus exprimées dans des cellules cancéreuses fortement invasives où elles participent à l'invasivité de ces cellules (Hinton *et al.*, 2009). Le rôle de la V-ATPase dans les cellules cancéreuses semble impliquer principalement un effet sur la régulation du pH et non un rôle de la protéine en elle-même.

Le ciblage de l'activité de la V-ATP a été proposé comme une nouvelle stratégie de traitement des cancers (Spugnini *et al.*, 2010). Une molécule inhibitrice de la V-ATP, l'esomeprazole

utilisée comme une prodrogue activée par un pH acide, diminue la croissance de tumeurs et le gradient de pH des tumeurs *in vivo* (De Milito *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de V-ATPase pourraient également être utilisés dans le cadre de résistances aux chimiothérapies. En effet, l'expression de plusieurs sous-unités de la V-ATPase est augmentée par un agent de chimiothérapie, le cisplatine (Murakami *et al.*, 2001; Torigoe *et al.*, 2002). Cette augmentation d'expression est impliquée dans des phénomènes de chimiorésistance, il a donc été proposé que l'inhibition de la V-ATPase permettrait d'augmenter la cytotoxicité du cisplatine et pourrait être une nouvelle stratégie pour éviter les résistances à ce composé. De plus un prétraitement de cellules cancéreuses avec un inhibiteur de la V-ATPase sensibilise les cellules au 5-fluorouracile et à la vinblastine (Luciani *et al.*, 2004).

3. Transporteurs proton-lactate (MCT)

Les transporteurs de monocarboxylates (MCT) permettent le transport de lactate, de corps cétoniques ou de pyruvate. Cette famille comprend 14 isoformes parmi lesquelles seules les quatre premières permettent un transport de monocarboxylates dépendant des protons (Halestrap and Meredith, 2004). Les isoformes MCT1, MCT2, MCT3 et MCT4 sont des co-transporteurs membranaires électroneutres de protons et de lactate avec une stœchiométrie de 1:1. Ces protéines sont formées de 12 segments transmembranaires avec des domaines C- et N-terminaux cytoplasmiques ainsi qu'une large boucle intracellulaire entre les segments 6 et 7 (Poole *et al.*, 1996). Elles présentent des expressions tissulaires et des affinités pour le lactate différentes (Halestrap and Price, 1999). MCT4 est la seule isoforme dont l'expression est induite par l'hypoxie par un mécanisme dépendant de HIF-1α (Ullah *et al.*, 2006). Dans les cellules utilisant la glycolyse comme métabolisme énergétique, MCT4 est l'isoforme majeure dont les cinétiques lui permettent d'être adaptée à un export de lactate de ces cellules (Dimmer *et al.*, 2000). Dans certains tissus ces transporteurs permettent l'entrée de lactate ou de corps cétoniques afin d'être utilisés comme substrat énergétique (Halestrap and Meredith, 2004).

Dans les cellules cancéreuses, il a été démontré une expression importante de MCT1 et MCT4. MCT4 permet l'export de lactate produit par les cellules cancéreuses glycolytiques (hypoxiques), lactate qui va ensuite être capté par MCT1 exprimé dans les cellules cancéreuses oxydatives situées à la périphérie de la tumeur (Sonveaux *et al.*, 2008). MCT1 et

MCT4 possèdent un rôle *in vitro* dans l'invasivité de cellules cancéreuses pulmonaires (Izumi *et al.*, 2011) et MCT4 est impliqué dans la migration de cellules cancéreuses mammaires (Gallagher *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'expression de MCT1 est corrélée avec la progression des gliomes (Froberg *et al.*, 2001).

MCT1 et MCT4 sont associés à une protéine membranaire chaperonne CD147 (ou basigin ou EMMPRIN) permettant leur expression à la membrane plasmique (Kirk *et al.*, 2000). L'inhibition de l'expression de CD147 par un siRNA réduit l'expression et l'activité de MCT1 et MCT4 induisant alors une diminution du pH intracellulaire, de la prolifération et de l'invasivité *in vitro* mais aussi une diminution de la tumorigénicité *in vivo* (Schneiderhan *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2009). L'anhydrase carbonique II cytoplasmique interagit avec les transporteurs MCT1 et MCT4 et son expression induit une augmentation du transport de protons d'une manière indépendante de l'activité catalytique de l'anhydrase carbonique (Becker *et al.*, 2005; Becker and Deitmer, 2008; Becker *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent la formation d'un complexe protéique permettant la régulation du pH. L'expression de CD147 est associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de cancers (Davidson *et al.*, 2003; Marionnet *et al.*, 2003) de même que sa co-expression avec MCT1 ou MCT4 (de Oliveira *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2009; Pertega-Gomes *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2009).

L'utilisation d'un inhibiteur de MCT1, le α-cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) a été proposée afin d'inhiber l'entrée de lactate dans les cellules oxydatives qui devront alors utiliser du glucose comme substrat énergétique, glucose qui ne sera donc plus disponible pour les cellules glycolytiques du centre de la tumeur (Sonveaux *et al.*, 2008). L'utilisation de CHC montre une diminution de la croissance tumorale et une radiosensibilisation dans des modèles de tumeurs murines (Sonveaux *et al.*, 2008). Des effets similaires sont retrouvés lors de l'inhibition de l'expression de MCT1 par un siRNA (Vegran *et al.*, 2011). D'autres inhibiteurs ont été identifiés (Bueno *et al.*, 2007; Ekberg *et al.*, 2007). L'AZD3965 est en cours d'essai de phase I/II pour les tumeurs solides avancées. Aucune molécule spécifique de MCT4 n'est disponible et un problème de ciblage peut se poser puisque MCT4 est situé dans des cellules glycolytiques éloignées des vaisseaux sanguins.

4. Formation et transport des ions bicarbonates (HCO_3^-)

La régulation du pH des cellules fait intervenir en plus des protons, des ions bicarbonates. Le système tampon dioxyde de carbone / bicarbonate permet de réguler le pH et constitue le système tampon physiologique le plus important. Les anhydrases carboniques sont capables de catalyser la réaction du CO_2 avec l'H_2O pour produire des acides carboniques puis des bicarbonates et des protons : $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$. Ces bicarbonates peuvent être transportés dans les cellules pour neutraliser des protons et augmenter le pH intracellulaire. Le transport d'ions bicarbonates peut s'effectuer par divers co-transporteurs ou échangeurs utilisant différents ions associés.

a) Anhydrases carboniques

Les anhydrases carboniques (CA carbonic anhydrase) sont des métalloenzymes ubiquitaires exprimées chez les procaryotes et les eucaryotes et présentant des activités catalytiques et des distributions subcellulaires et tissulaires variées (Gilmour, 2010; Pastorekova *et al.*, 2004). Ces enzymes dont le site actif contient un ion zinc essentiel pour l'activité catalytique, catalysent la réaction d'hydratation réversible du dioxyde de carbone en ion bicarbonate et proton. Parmi les enzymes actives cinq anhydrases carboniques sont cytosoliques (CAI, CAII, CAIII, CAVII et CAXIII), cinq sont associées à la membrane et orientées vers le milieu extracellulaire (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV et CAXV), deux sont mitochondriales (CAVA et CAVB) et CAVI est secrétée. Trois sont dépourvues d'activité catalytiques CAVIII, CAX et CAXI. Les CA sont impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques dont la respiration et le transport de CO_2 et de HCO_3^- vers les tissus et les poumons, l'homéostasie du pH et du CO_2, certaines réactions de biosynthèse et la formation ou la résorption osseuse.

Il a été retrouvé une expression élevée de CAIX et CAXII dans des cellules cancéreuses mammaires (Bartosova *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2001) et dans de nombreux autres types de cancers (Chiche *et al.*, 2010). L'expression de CAIX et CAXII est induite par l'hypoxie via le facteur de transcription HIF-1 (Chiche *et al.*, 2009b; Wykoff *et al.*, 2000). Leur expression peut également être augmentée même en normoxie dans le cas de mutations rendant HIF-1α constitutivement actif (Grabmaier *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 1998; Wykoff *et al.*, 2000). L'expression de CAIX et de CAXII est corrélée avec celle de HIF-1α dans les zones hypoxiques des tumeurs distantes des vaisseaux (Chiche *et al.*, 2009b). De plus l'activité de

CAIX est augmentée par un milieu acide comme celui retrouvé dans les tumeurs (Alterio *et al.*, 2009). En hypoxie, l'induction de l'expression de CAIX contribue à acidifier l'environnement extracellulaire des cellules cancéreuses et donc participe à la régulation du pH (Chiche *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2009; Svastova *et al.*, 2004; Swietach *et al.*, 2009). L'inhibition *in vitro* de CAIX induit une diminution de la prolifération cellulaire (Robertson *et al.*, 2004) et une induction de l'apoptose (Cianchi *et al.*, 2010). L'inhibition de CAIX et CAXII dans des modèles de tumeurs murines induit un ralentissement de la croissance tumorale (Ahlskog *et al.*, 2009; Chiche *et al.*, 2009b). CAIX et CAXII semblent également impliquées dans la migration cellulaire *in vitro* (Chiche *et al.*, 2009a; Hsieh *et al.*, 2010). CAIX possède un rôle dans l'adhésion cellulaire (Svastova *et al.*, 2003). L'inhibition de CAIX augmente la sensibilité aux traitements anti-VEGF (McIntyre *et al.*, 2012) ou à la radiothérapie (Dubois *et al.*, 2011). Il existe également une compensation entre différentes isoformes d'anhydrases carboniques puisqu'une augmentation de l'expression de CAXII est observée lors de la diminution de CAIX (Chiche *et al.*, 2009b). Le mécanisme par lequel ces anhydrases carboniques participent à la régulation du pH intracellulaire et extracellulaire semble lié à un couplage entre CA et transporteurs de bicarbonates capables de transporter les bicarbonates produit pas l'anhydrase carbonique vers le milieu intracellulaire (Morgan *et al.*, 2007).

L'expression de CAIX dans les tumeurs est associée à une augmentation des métastases et à un mauvais pronostic de survie (Chia *et al.*, 2001; Haapasalo *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2007; Loncaster *et al.*, 2001; Maseide *et al.*, 2004; Potter and Harris, 2004). L'expression de CAXII est également associée à un mauvais pronostic (Haapasalo *et al.*, 2008) mais son rôle n'est pas clairement défini puisque plusieurs études révèlent CAXII comme un facteur de bon pronostic (Ilie *et al.*, 2010; Watson *et al.*, 2003). Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'expression de CAIX est associée à celle des récepteurs aux œstrogènes (Chia *et al.*, 2001) et aux résistances à l'épirubicine (Generali *et al.*, 2006). De nouveaux inhibiteurs développés récemment permettent de diminuer la formation de métastases dans un modèle de tumeurs mammaires (Lou *et al.*, 2011; Pacchiano *et al.*, 2011). Plusieurs composés inhibiteurs d'anhydrases carboniques sont en cours d'essais cliniques pour plusieurs types de cancers (Neri and Supuran, 2011).

Une anhydrase carbonique intracellulaire, CAII, semble également être retrouvée dans certains cancer comme des cancers cérébraux (Parkkila *et al.*, 1995) et être associée à un

mauvais pronostic dans les médulloblastomes (Nordfors *et al.*, 2010) alors que son expression est associée à une meilleurs survie dans des tumeurs stromales gastro-intestinales (Parkkila *et al.*, 2010). Il existe également des relations de compensation puisque la réduction d'expression de CAIX induit une augmentation d'expression de CAII et réciproquement (Pan *et al.*, 2006).

b) Transporteurs de bicarbonates

Chez les mammifères, 15 gènes codent pour des protéines de transport des bicarbonates. Ces gènes font partie de la famille des *SLC4A* et *SLC26A* (Wain *et al.*, 2004). Les gènes de la famille des *SLC4A* sont séparés en deux groupes fonctionnellement différents (Cordat and Casey, 2009). Les échangeurs Cl^-/HCO_3^- électroneutres comportent 3 membres nommés AE (anion exchangers) utilisant le gradient de concentration du Cl^- pour transporter les HCO_3^-. Un échangeur Cl^-/HCO_3^- dépendant du sodium et électroneutre (NDCBE) ayant une stœchiométrie $1Na^+ :2\ HCO_3^- :1Cl^-$ fait également partie de cette famille (Grichtchenko *et al.*, 2001). Les co-transporteurs Na^+/HCO_3^- (NBC Na^+-coupled bicarbonates transporters) utilisent le gradient de sodium pour transporter les bicarbonates. Ces transporteurs peuvent être électrogéniques (NBCe1 et NBCe2) ou électroneutres (NBCn1 et NBCn2) en fonction de leur stœchiométrie. Deux derniers gènes *SLC4A9* et *SLC4A11* appartiennent à cette famille mais leur fonction n'est pas clairement définie. La famille des *SLC26A* contient 10 membres parmi lesquels 5 codent pour des échangeurs Cl^-/HCO_3^- pouvant être électroneutres ou électrogéniques (Mount and Romero, 2004). Tous ces transporteurs possèdent des rôles physiologiques variés et peuvent être impliqués dans des pathologies (Cordat and Casey, 2009).

Peu de choses sont connues concernant l'implication des transporteurs de bicarbonates dans les cellules cancéreuses. Ces transporteurs ont été proposés comme impliqués dans la régulation du pH des cellules cancéreuses dans des revues récentes (Harguindey *et al.*, 2009; Pouyssegur *et al.*, 2006; Swietach *et al.*, 2007). Leur implication a été initialement étudiée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le DIDS peu spécifique d'un seul transporteur et inhibant également des canaux perméables aux ions Cl^-. Cet inhibiteur diminue le pH_i de cellules cancéreuses *in vitro* (Boyer and Tannock, 1992; Rotin *et al.*, 1987) et diminue la croissance tumorale *in vivo* mais possède une toxicité limitant son utilisation thérapeutique potentielle (Yamagata and Tannock, 1996).

Les échangeurs Cl^-/ HCO_3^- AE1 et AE2 semblent impliqués dans certains cancers. Il a été retrouvé une expression cytoplasmique de AE1 dans des cancers du colon et de l'estomac qui permettrait d'augmenter la prolifération cellulaire (Shen *et al.*, 2007). Dans les cancers gastriques, l'expression de AE1 est un facteur de mauvais pronostic (Xu *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de AE1 par un siRNA diminue la croissance tumorale dans deux modèles de cancers gastriques (Suo *et al.*, 2012). L'expression du transporteur AE2 est diminuée dans les cancers gastriques comparés à des tissus normaux (Yang *et al.*, 2008). L'inhibition de AE2 dans des cellules d'hépatocarcinome connues pour le surexprimer diminue la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose (Hwang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008). Le transporteur AE2 peut être régulé au niveau transcriptionnel par le suppresseur de tumeur pVHL (von Hippel-Lindau) (Karumanchi *et al.*, 2001). Un inhibiteur spécifique du transporteur NDCBE a été développé (le S3705) et a permis de démontrer une implication de ce transporteur dans la régulation du pH et la prolifération de cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Wong *et al.*, 2002) mais il montre peu d'effet *in vivo* (Wong *et al.*, 2005). Dans un autre modèle cellulaire il a été montré que cet inhibiteur inhibe la phosphorylation des kinases ERK 1/2, AKT et BAD impliquées dans la prolifération cellulaire (Di Sario *et al.*, 2007).

Parmi les co-transporteurs Na^+/ HCO_3^- (NBC) seuls NBCn1 et NBCe1 ont été retrouvés associés à certaines cellules cancéreuses. Le gène *SLC4A7* codant pour NBCn1 est diminué dans 64 % de tumeurs mammaires comparées aux tissus sains (Chen *et al.*, 2007b). Il a été montré que l'hypoxie pouvait réduire l'expression de ce gène (Chen *et al.*, 2007a). Une étude sur les loci de susceptibilité au cancer du sein a identifié deux nouvelles régions dont une contenant le gène *SLC4A7* (Ahmed *et al.*, 2009). L'expression d'un récepteur ErbB2 constitutivement actif, souvent retrouvé dans des cancers du sein, induit une augmentation de l'expression de NBCn1 (Lauritzen *et al.*, 2010). L'expression du gène *SLC4A4* codant pour le transporteur NBCe1 est diminuée dans des cancers de la thyroïde (Kim *et al.*, 2010). Ce transporteur est également retrouvé dans des cancers du rein où son expression est située au niveau de la membrane plasmique mais aussi dans les compartiments intracellulaires alors qu'il se situe seulement à la membrane plasmique de tissus rénaux non cancéreux (Yamada *et al.*, 2003). Il semble impliqué dans les phénomènes de chimiorésistance (Mencia *et al.*, 2011). L'implication de ces transporteurs dans les propriétés de prolifération ou d'invasivité des cellules cancéreuses reste à étudier.

D. Influence du pH et de ses régulateurs dans les invadopodes et podosomes

Le pH intracellulaire et extracellulaire ainsi que sa régulation sont fortement impliqués dans les propriétés d'invasivité des cellules cancéreuses et dans le développement de métastases. L'étude des invadopodes, structures responsables d'une dégradation focalisée et intense de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses, est un champ nouveau et en constante progression pour la compréhension des mécanismes de l'invasivité cellulaire.

La revue suivante décrit les connaissances actuelles concernant le rôle du pH et de ses régulateurs dans l'activité des invadopodes des cellules cancéreuses et des structures proches dans les cellules non cancéreuses que sont les podosomes.

pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting.

BRISSON L., RESHKIN S.J., GORÉ J. & ROGER S.

Eur J Cell Biol. 2012 Jun 4. [Epub ahead of print]

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

European Journal of Cell Biology xxx (2012) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.de/ejcb

Review

pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting

Lucie Brisson[a], Stephan J. Reshkin[b], Jacques Goré[a], Sébastien Roger[a,*]

[a] Nutrition, Growth and Cancer, Université François-Rabelais de Tours, Inserm U1069, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France
[b] Department of Biosciences, Biotechnology and Pharmacological Sciences, University of Bari, Via Amendola 165A, I-70126 Bari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 March 2012
Received in revised form 18 April 2012
Accepted 19 April 2012

Keywords:
Podosomes
Invadopodia
pH regulation
Na^+/H^+ exchanger
Vacuolar-ATPase
Extracellular matrix remodeling
Proteases
Cell invasiveness
Osteoclasts
Cancer cells

ABSTRACT

Invadosomes are actin-rich finger-like cellular structures sensing and interacting with the surrounding extracellular matrix (ECM) and involved in its proteolytic remodeling. Invadosomes are structures distinct from other adhesion complexes, and have been identified in normal cells that have to cross tissue barriers to fulfill their function such as leukocytes, osteoclasts and endothelial cells. They also represent features of highly aggressive cancer cells, allowing them to escape from the primary tumor, to invade surrounding tissues and to reach systemic circulation. They are localized to the ventral membrane of cells grown under 2-dimensional conditions and are supposed to be present all around cells grown in 3-dimensional matrices. Indeed invadosomes are key structures in physiological processes such as inflammation and the immune response, bone remodeling, tissue repair, but also in pathological conditions such as osteopetrosis and the development of metastases. Invadosomes are subdivided into podosomes, found in normal cells, and into invadopodia specific for cancer cells. While these two structures exhibit differences in organization, size, number and half-life, they share similarities in molecular composition, participation in cell-matrix adhesion and promoting matrix degradation. A key determinant in invadosomal function is the recruitment and release of proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), serine proteases and cysteine cathepsins, together with their activation in a tightly controlled and highly acidic microenvironment. Therefore numerous pH regulators such as V-ATPases and Na^+/H^+ exchangers, are found in invadosomes and are directly involved in their constitution as well as their functioning. This review focuses on the participation of pH regulators in invadosome function in physiological and pathological conditions, with a particular emphasis on ECM remodeling by osteoclasts during bone resorption and by cancer cells.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Invadosomes were described for the first time approximately 30 years ago (David-Pfeuty and Singer, 1980; Tarone et al., 1985), and their study has become a fast growing research field quite recently. As such, the "Invadosome consortium" was created in order to gather people interested in all aspects of physiological and pathological tissue invasion (http://www.invadosomes.org). Also, recent reviews have very nicely summarized the history and all aspects of invadosomes constitution and functioning (Linder et al., 2011; Murphy and Courtneidge, 2011; Saltel et al., 2011). Podosomes and invadopodia define the two members of the invadosome family (Linder, 2009) proposed to be located in both normal cells (from monocytic lineage, or endothelial and smooth muscle cell types) and cancer cells, respectively. They represent highly dynamic actin-rich structures, found at the ventral side of adherent cells grown on 2-dimensions surfaces, involved in cell-extracellular matrix (ECM) adhesion and defining particular intracellular and pericellular microdomains. These domains are proposed to be sensors of physicochemical properties of the ECM, and it has been demonstrated that the rigidity of ECM influences the number, the spacing and the activity of both invadopodia and podosomes (Alexander et al., 2008; Collin et al., 2006; Parekh et al., 2011; Shattil et al., 2010). Invadosomes not only establish close contact with the ECM but also degrade it proteolytically through the recruitment of membrane-associated and the release of soluble proteases belonging to different classes. Indeed, invadosomes are involved in matrix remodeling and more generally in physiological and cancerous cellular invasiveness, a property which distinguishes them from other actin-rich adhesion structures (Chen, 1989; Kelly et al., 1994; Mueller and Chen, 1991). This matrix degradation is the principal property used in *in vitro* systems to identify invadosomes and distinguish them from other actin-rich structures from cells grown in two dimensional (2D)-matrices (Ayala et al., 2006; Baldassarre et al., 2003; Bowden et al., 2006). In tissues, cells are completely surrounded by ECM and by other cells, such that they exhibit particular morphologies.

* Corresponding author at: Inserm U1069, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. Tel.: +33 2 47 36 61 30; fax: +33 2 47 36 62 26.
E-mail address: sebastien.roger@univ-tours.fr (S. Roger).

0171-9335/$ – see front matter © 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

In this scenario, cancer cell invasiveness was proposed to show different patterns such as ameboid *versus* mesenchymal migrations. The invasion of the ECM is a property exhibited by single cells showing changes in their shape, points of focalized adhesion and proteolysis of the matrix and actomyosin contractions, but could also be a multicellular phenomenon of migrating cells (this is called collective invasion) in which a leader cell is generating a path in the matrix by a proteolytic activity, which is then enlarged to an avenue by following cells (Friedl and Alexander, 2011; Wolf et al., 2009). Indeed, structures observed in 2D and their dynamics might not be completely identical to *in vivo* conditions and there are now more and more attempts to study invadosome occurrence and function in three dimensional-matrices (Schoumacher et al., 2011).

Podosomes are found in normal cells that have to cross or to remodel tissue barriers such as osteoclasts (Destaing et al., 2003; Oreffo et al., 1988; Zambonin-Zallone et al., 1988), macrophages (Linder et al., 1999; Messier et al., 1993), dendritic cells (Binks et al., 1998; Bodin and Burnstock, 2001), endothelial cells (Moreau et al., 2003; Osiak et al., 2005) or vascular smooth muscle cells (Burgstaller and Gimona, 2005), whereas invadopodia are specific to cancerous or transformed cells, are involved in cancer cells invasiveness (Monsky and Chen, 1993), and could correlate with metastatic potential (Coopman et al., 1998; Thompson et al., 1992). Invadopodia and podosomes both promote ECM degradation and while sharing lots of similarities in molecular composition and functioning, they display significant differences in terms of structural organization and life-time. Podosomes are non-protrusive and relatively small structures (1 μm diameter × 0.4 μm height) that extend into the intracellular space. They are constituted by a central F-actin-rich core surrounded by a ring of integrins and associated proteins such as paxillin and talin, providing attachment to the substratum (Mueller and Chen, 1991) and are highly dynamic, with a turnover of 2–10 min. In contrast, invadopodia are much bigger and protrusive structures (8 μm diameters × 5 μm depths) extending more deeply into the ECM. While the core of invadopodia is also constituted of F-actin filaments, they lack the surrounding ring of integrins. They are more stable than podosomes and can persist several hours. Another difference is the quantity of such structures per invasive cell: podosomes are found in high quantities, often more than 100 units per cell, whereas there are only a few invadopodia (Artym et al., 2011; Buccione et al., 2004; Linder et al., 2011; Weaver, 2006). Therefore the ECM degradation activity of invadopodia and podosomes show some differences: podosomes, expressed in high number and having a fast turnover, tend to degrade in a widespread and shallow manner whereas the matrix degradation by invadopodia is more focused and deeper (Linder, 2007).

Intracellular and extracellular pH play a major role in the regulation of many physiological and tumorigenic processes because of the high reactivity of protons (H^+) continuously produced by the cellular metabolism, which modulates the activity of numerous proteins, especially enzymes. Indeed, the intracellular pH (pHi) is a tightly controlled parameter kept in ranges between 6.9 and 7.2 in physiological conditions (Casey et al., 2010). Indeed acid equivalents have to be continuously neutralized by the carbonic acid/bicarbonate buffer or even exported to the extracellular environment in order to maintain an optimal intracellular pH compatible with cell functions.

Intracellular as well as pericellular pH are significant regulators of cell function including normal and cancerous cell adhesion, motility and tissue invasion. Therefore, many pH regulators such as Na^+/H^+ exchangers (NHE), vacuolar H^+-ATPases (V-ATPases), carbonic anhydrases (CAs), H^+/lactate cotransporters (monocarboxylic transporters, MCT), have been shown to be critical for regulating normal and cancer cell invasiveness (Cardone et al., 2005). Recently, many of these pH regulators have been proposed to be located in invadosomes. Indeed, this review is aimed to provide a new light on the involvement of particular membrane and soluble proteins, known to transport or neutralize acid equivalents, into the control of intracellular and extracellular pH at the invadosome and the role of such proteins on invadosomes biogenesis and function.

General considerations on pH regulation

Intracellular and pericellular pH regulations in non-cancerous adherent cells

While there might be some differences from tissue to tissue, in general the intracellular pH of normal and differentiated (non-cancerous) cells is generally maintained between 6.9 and 7.2 and is slightly more acidic than the extracellular pH which is around 7.2–7.4 under physiological conditions (Cardone et al., 2005; Casey et al., 2010). However there is a continuous production of intracellular protons, mainly coming from metabolic pathways generating ATP, either from cytoplasmic glycolysis or from mitochondrial oxidative phosphorylation. Moreover, this production of protons is further increased in periods of activity such as muscle contraction or in anaerobic situations when glycolysis is enhanced. Cells maintain their intracellular concentration of protons by transporting acid equivalents across the plasma membrane using a variety of specific membrane transporters such as protons exchangers, bicarbonates transporters and pumps (Boron, 1986, 2004; Casey et al., 2010; Madshus, 1988). Indeed there are numerous plasma membrane proteins that are essential for maintaining pHi, some of them being passive transporters (depending on ion electrochemical gradients) while others are active ATPases. Important pH modulators of cytosolic and intracellular compartments are made up of members of the Na^+/H^+ exchanger (NHE) family which comprises 9 classically described isoforms (NHE1–NHE9) with different subcellular localization and cell-type distribution. A tenth isoform (NHE10) has been described more recently to be expressed in osteoclasts and while it does not regulate the intracellular pH, it is proposed to be associated with osteoclast differentiation and survival (Lee et al., 2008). At the plasma membrane, NHE exchangers catalyze the electroneutral exchange of H^+ and Na^+ with a 1:1 (or 2:2) ratio, driven by the inwardly directed electrochemical Na^+ gradient, and are widely known as acid extruders also involved in cellular volume regulation (Orlowski and Grinstein, 1997). The ubiquitously expressed and best described isoform is the plasma membrane NHE type 1 (NHE1) cloned by Jacques Pouysségur's group in 1989 (Sardet et al., 1989) and is the main isoform responsible for cytosolic pH homeostasis (Landau et al., 2007; Malo and Fliegel, 2006; Orlowski and Grinstein, 2004). This exchanger possesses an intracellular pH-sensitive regulatory site which is responsible for its being quiescent at pHi $\geq$7.2. Indeed NHE1 is highly dynamic and mostly activates upon intracellular acidification. The electrogenic vacuolar-type H^+-ATPase (V-ATPase) also extrudes H^+ in the extracellular space. While it was initially found to be located in endomembranes of organelles such as endosomes, lysosomes, clathrin-coated vesicles, Golgi-derived vesicles, secretory vesicles and in vacuoles of fungi and plants, it is also expressed at the plasma membrane of several cell types, including epithelial cells and osteoclasts, and extrudes protons against their gradient by consuming ATP (Beyenbach and Wieczorek, 2006; Forgac, 2007; Hinton et al., 2009; Wagner et al., 2004). While they modulate pHi and are able to prevent intracellular acidification in some conditions, their primary role in osteoclasts is associated with bone resorption (Nordstrom et al., 1995).

Cells constantly produce highly diffusible CO_2 from catabolic reactions. In the presence of water, CO_2 is converted into

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS
L. Brisson et al. / European Journal of Cell Biology xxx (2012) xxx–xxx

a weak acid conjugate (H_2CO_3) which generates bicarbonates and protons according to the following reactions: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$. Therefore, both hydration of carbonic dioxide and transport of bicarbonates represent important parameters in pHi and pHe modulation. While the interconversion of CO_2 and HCO_3^- occurs spontaneously, it is greatly accelerated by metalloenzymes of the carbonic anhydrase (CA) family (Boron, 2004). Carbonic anhydrases are metalloenzymes showing a large expression in vertebrates and mammals. In humans these enzymes have 15 isoforms, including three carbonic anhydrase-related proteins (CA8, CA10 and CA11) which might be acatalytic. These enzymes exhibit specific cellular localizations, some of them being found in the cytosol (CA1, CA2, CA3, CA7, CA8 and CA13), while other are restricted to the mitochondria (CA5A and CA5B), or at the plasma membrane with an extracellular catalytic domain (CA4 which is bound to the membrane thanks to a GPI-anchor, and CA9, CA12, and CA14 presenting in their structure a transmembrane domain). Another isoform (CA6) is secreted out of cells (Pastorekova et al., 2004; Supuran, 2008b). In this context, CAs control pH changes at particular sites. Bicarbonate ions (HCO_3^-), whose production partially depends on CAs, constitute important physiological pH buffers and are transported inside the cells in order to neutralize protons and to alkalinize pHi such that bicarbonate transporters can be considered as acid extruders (Cordat and Casey, 2009). This occurs through electroneutral or electrogenic Na^+/HCO_3^- co-transporters (NBCs for Na^+-coupled bicarbonates transporters, NBCn being electroneutral while NBCe are electrogenic), depending on the stoichiometry of the exchange, or electrogenic Na^+-dependent Cl^-/HCO_3^- exchangers (NDCBE) or electroneutral Cl^-/HCO_3^- exchangers (AE, anionic exchangers) manners in order to neutralize protons and to alkalinize pHi (Cordat and Casey, 2009). Monocarboxylate-H^+ cotransporters allow the electroneutral co-transport of lactate and protons. They are particularly responsible for an intracellular re-alkalinization in particular conditions of anaerobic production of pyruvate and its conversion into lactate thanks to the cytosolic lactate deshydrogenase (LDH). Indeed, while they are important in muscle cells after anaerobic exercise, they have a limited role in the regulation of the intracellular pH in non-cancerous non-muscle cells. As can be seen, the function of most of the transporters presented above is dependent on the electrochemical gradient of Na^+ which is maintained by the electrogenic Na^+/K^+ ATPase (exchanging 3 Na^+ with 2 K^+ with the hydrolysis of one ATP), and therefore its activity is critical in regulating intracellular pH as well as membrane potential and other cellular functions.

The intracellular pH is a key cellular parameter and every change in the cytosolic pH can modify the activity of numerous enzymes which results in the modification of key cellular processes such as cell proliferation or apoptosis (Bierman et al., 1988; Pouyssegur et al., 1985; Schelling and Abu Jawdeh, 2008), cell metabolism (Dietl et al., 2010; Kuwata et al., 1991; Webb et al., 2011), cytoskeletal dynamics, cell polarization and cell migration (Martin et al., 2011; Stock and Schwab, 2009; Frantz et al., 2007, 2008; Koivusalo et al., 2010; Srivastava et al., 2008). While all these processes might be mainly dependent on the intracellular pH, rather than on the activity of a specific pH regulator, some pH regulators have been associated with specific cellular functions. For example, V-ATPase is involved in membrane trafficking, lysosome or secretory vesicles acidification necessary for activity of hydrolases or proteases, acid-base balance in renal tubule and, finally, in osteoclast mediated bone resorption (Hinton et al., 2009). Also the NHE1, besides its general role in pHi regulation, could also serve as a plasma membrane anchor for cortical actin filaments and be involved in cytoskeletal organization and dynamics and therefore in cell migration (Denker and Barber, 2002; Putney et al., 2002).

On the existence of pH gradients into the cells

Until the beginning of the 90s it was considered that intracellular pH was uniform inside the cell because of the small size of protons and buffers which rapidly and easily diffuse into the different cellular compartments, including the cytosol. However, as initially demonstrated from molluscan axoplasm and then from rabbit ventricular myocytes, there is a more complex distribution and mobility of H^+, giving rise to particular pH microdomains and therefore to the creation of intracellular pH gradients inside the cells (al-Baldawi and Abercrombie, 1992; Spitzer et al., 2002; Vaughan-Jones et al., 2002). Indeed, the creation of pH gradients have been measured in bigger cells such as cardiac myocytes during the extracellular application of weak acids or bases (Spitzer et al., 2000). The existence of such pH gradients has been generalized to polarized cells such as epithelial cells and could also be the result of the asymmetric distribution of H^+ and HCO_3^- transporters in the apical *versus* basolateral membranes and this being associated with the epithelial function. As such, intracellular pH gradients have been observed in duodenal enterocytes during apical acid transport activation (Stewart et al., 1999), and in enterocyte monolayer cultures (Gonda et al., 1999).

Additionally, the formation of pH gradients is also observed in migrating cells (Klein et al., 2000; Martin et al., 2011), a property which has been particularly studied in cancer cells (Stock and Schwab, 2009) and would be relevant for metastatic dissemination (see following section "pH regulation in cancer cells and formation of invadopodia"). The extracellular cell surface of migrating cells is shown to be more acidic at the leading edge, *i.e.* the lamellipodium, than in the rear end of the cell (Stock et al., 2007; Stuwe et al., 2007). Conversely, the intracellular pH of migrating cells is more acidic at the rear end than at the leading edge (Martin et al., 2011). These intracellular and perimembrane pH gradients are proposed to be due to a polarized repartition of NHE and AE exchangers (Klein et al., 2000). Particularly, NHE1 is predominantly localized in lamellipodia of fibroblasts where it serves as a plasma membrane anchor for cytoskeletal filaments and especially for F-actin through the binding to ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) family actin-binding proteins (Denker and Barber, 2002; Denker et al., 2000), and in pseudopodia of invasive transformed epithelial cells (Lagana et al., 2000). It is proposed that protons extruded, mostly by NHE1 exchangers, are responsible for an extracellular acidification at the leading edge of migratory cells which is favorable to the establishment and dynamics of cell/matrix interactions, and to the activity of numerous proteases necessary for ECM digestion (Stock et al., 2008). This specificity of NHE1 membrane localization during migration is also observed in single-celled eukaryotes such *Dictyostelium discoideum* in which it also localizes to the leading edge of polarized cells (Patel and Barber, 2005).

Indeed, these observations of pH gradients, due to specific pH regulators' spatial organization suggest that proton efflux may be spatially organized and cause pH microdomains associated with physiological functions. One of the best known physiological examples is that observed in podosomes from osteoclasts whose activity is associated with bone resorption and remodeling.

pH regulation in osteoclast podosomes

Mechanism of bone resorption by osteoclast and role of pH regulators

Bones are highly dynamic structures that renew many times during the lifespan *via* an equilibrium between the resorbing activity of osteoclasts and the bone formation activity of osteoblasts (Zhao and Patrick Ross, 2007). Osteoclasts are multinucleated cells

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

coming from a hematopoietic origin and specialized in bone resorption which is a multifactorial process consisting of: the recognition and adhesion to the bone surface, the establishment of a cell polarity, cell migration, the degradation of organic bone matrix and the dissolution of inorganic minerals. Osteoclast functioning, and, therefore, bone resorption depends on the ability to generate H^+ and to extrude them into a sealed compartment between itself and the ECM (Rousselle and Heymann, 2002). This specialized compartment, which is generally called Howship's lacunae, is delimited by a sealing zone between the osteoclast's membrane and the bone matrix thanks to integrin receptors and a dense ring of F-actin-rich podosomes. Protons are secreted, through the osteoclast ruffled border, into this resorptive cavity leading to its acidification to pH 4.5–4.8 and allowing both effective dissolution of hydroxyapatite and mineralized bone matrix into Ca^{2+}, H_3PO_4, H_2CO_3, water and degradation of the organic matrix (Baron, 1989; Calle et al., 2004; Delaisse et al., 2000; Riihonen et al., 2007; Vaananen et al., 2000). The degradation of the organic matrix is fulfilled by collagenases which are secreted into the lacunae (Vaananen and Laitala-Leinonen, 2008). These are mostly the acidic cathepsin K, but also the matrix metalloproteinase MMP-9 and possibly the membrane-bound MT1-MMP (also known as MMP-14) (Andersen et al., 2004).

It is generally well known that protons are produced at high levels inside osteoclasts by the cytosolic carbonic anhydrase 2 (CA2) (Gay and Mueller, 1974) after catalyzing the hydration of the metabolic CO_2 into H_2CO_3 and its dissociation into H^+ and HCO_3^-. The main transporter responsible for subsequent proton extrusion and extracellular acidification may be the vacuolar H^+-ATPase (V-ATPase) (Mattsson et al., 1994). This proton efflux is associated with a chloride secretion through ClC-7 channels (Kornak et al., 2001). The V-ATPase is a multiprotein complex which has been found to be localized to the plasma membrane of osteoclasts (Mattsson et al., 1994) and proposed to regulate osteoclast pHi (Nordstrom et al., 1995). Indeed the expression level of both CA2 and subunits of V-ATPase have been shown to be associated with the osteoclastic proteolytic function (Laitala and Vaananen, 1993) and both their expressional or pharmacological (bafilomycin A1) inhibition were found to inhibit bone resorption (Laitala and Vaananen, 1994; Sundquist et al., 1990). Moreover mutations in genes encoding subunits of the V-ATPase have been shown to be associated with severe bone diseases such as osteopetrosis (Kornak et al., 2000; Li et al., 1999; Scimeca et al., 2000). The V-ATPase was found to be mainly expressed in the ruffled membrane (Mattsson et al., 1997; Vaananen et al., 1990), and associated with the lacunae acidification (Baron et al., 1985; Blair et al., 1989) by extruding H^+ coming from carbonic acid dissociation, while a Cl^-/HCO_3^- exchanger expressed at the opposite basolateral cell membrane would be responsible for HCO_3^- efflux (Hall and Chambers, 1989; Schlesinger et al., 1994) and to maintain cytoplasmic pH homeostasis (Teti et al., 1989a). It has been proposed that this bicarbonate efflux was dependent on the anionic exchanger type 2 (AE2) which is expressed in the contra-lacunar plasma membrane and for which the expression knock-down also results in osteopetrosis (Josephsen et al., 2009). As indicated, the mineral dissolution of the bone matrix leads to the production of large quantities of bicarbonate from the hydroxyapatite which would rapidly neutralize protons in the lacunae if they were not removed. Thus, it has been shown that the Na^+–HCO_3^- co-transporter NBCn1 is expressed in osteoclasts (Bouyer et al., 2007), proposed to be located in the ruffled border (Riihonen et al., 2010) and is important for the maintaining of osteoclastic function, pHi and survival. In addition, Na^+/H^+ exchangers have been found to contribute to pHi regulation at the basolateral membrane of osteoclasts, and that their pharmacological inhibition using amiloride and dimethylamiloride strongly impairs bone resorption (Hall and Chambers, 1990; Nordstrom et al., 1995). Particularly, NHE activity seemed to be crucial in early stages of osteoclast activation (Hall et al., 1992). It has been postulated that in non-resorptive osteoclasts the control of pHi was exclusively depending on NHE while in resorptive osteoclasts it was under the dependence of both NHE and V-ATPase (Kajiya et al., 2003; Lees et al., 2001; Lehenkari et al., 1997) (see Fig. 1).

Podosomes and pH regulators in osteoclasts functioning

As indicated previously, the resorptive activity of the osteoclast depends primarily on its adhesion to the bone matrix and on the establishment of an extracellular compartment completely sealed from other parts of the matrix in order to be acidified and to concentrate released proteases. Adhesion of osteoclasts to the bone matrix and the subsequent formation of a sealing zone is proposed to be mediated by integrins and most particularly to the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) (Nakamura et al., 1999; Teti et al., 1989b) which has been shown to promote the polarized rearrangement of actin cytoskeleton to form the podosome's F-actin rich structures (Destaing et al., 2003). Indeed, osteoclasts form a podosomal belt and a circumferential actin ring, corresponding to the sealing zone in mineralized substrates which allows the sealing off of the resorption compartment. It has been suggested that the fusion of isolated podosomes could give rise to a continuous sealing zone (Lakkakorpi et al., 1993; Lakkakorpi and Vaananen, 1996). An alternative hypothesis is that the sealing zone and the podosome belt might be different actin-rich structures. The formation of one or of the other structure could depend on the substrate upon which osteoclasts are in contact (Jurdic et al., 2006; Saltel et al., 2004). Particularly, a sealing zone necessary for bone resorption is observed when osteoclasts are cultivated on matrices containing apatite structures, while podosome clusters evolving into podosome belts are identified when osteoclasts are adherent to glass. Although individual podosomes cannot be observed in the sealing zone by classical fluorescence microscopy, the use of high resolution microscopy demonstrated that this structure is composed of structural units clearly related to individual podosome cores and interconnected by radial actin fibers, called the F-actin clouds. This primarily differs in density and interconnectivity from the podosome belts observed on other substrates (Jurdic et al., 2006; Luxenburg et al., 2007). Although $\alpha_v\beta_3$ integrin seems to be the most important matrix receptor for osteoclast adhesion, other cell surface receptors are also expressed such as $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ and CD44. CD44 is a transmembrane proteoglycan which is a receptor for hyaluronic acid, but also for osteopontin, collagen and laminin contained in the matrix. Chabadel and collaborators have shown that CD44 receptors were expressed in podosomes and suggested that two types of F-actin-rich domains could participate in the formation of the podosome belt: a podosome core domain in which a vertical F-actin network is nucleated at the membrane *via* the CD44 receptor and actin polymerization machinery including cortactin, and a transversal F-actin cloud nucleated to the membrane by the $\alpha_v\beta_3$ integrin (Chabadel et al., 2007). However, the sealing zone seems to be only formed when apatite minerals are present in the matrix, suggesting that while podosome formation is necessary for cell adhesion, other extracellular signals are involved in regulation of podosome organization (Saltel et al., 2004).

Relationships between pH regulators, the intracellular pH and the formation of podosomes in osteoclasts were identified from the very beginning of podosome research. Indeed, Teti and collaborators described that an experimental intracellular acidification, by butyric acid, induced an increase of podosome formation in the sealing zone, while the intracellular alkalinization by HCO_3^- reduced the percentage of osteoclasts with podosomes (Teti et al., 1989a). Moreover it seems that intracellular pH regulators have a specific subcellular localization enabling the formation of acids

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS
L. Brisson et al. / European Journal of Cell Biology xxx (2012) xxx–xxx

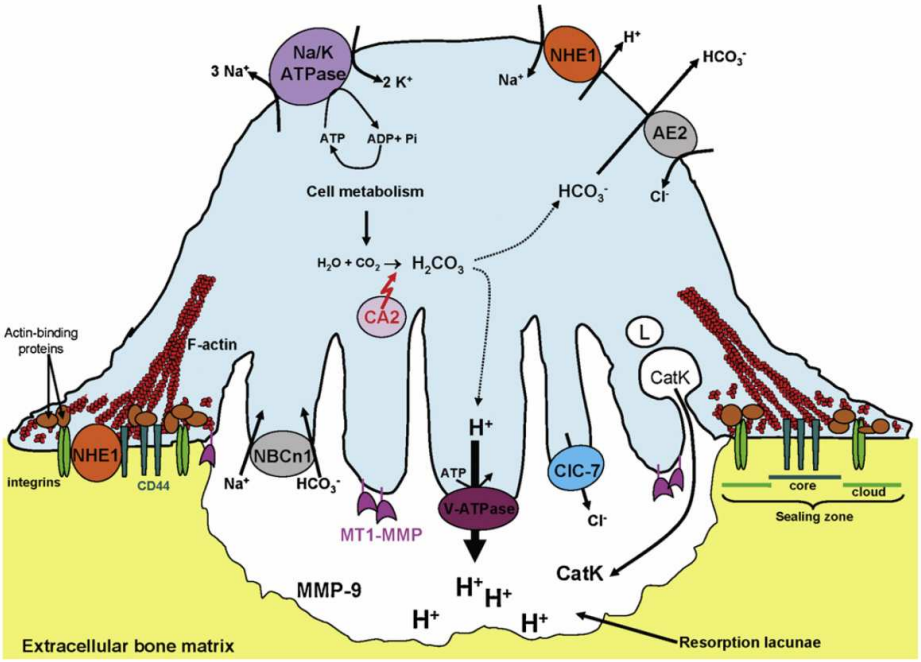


Fig. 1. Importance of pH regulators in the podosomal activity of a bone-matrix resorbing osteoclast. Polarized osteoclasts remodel the extracellular bone matrix (both organic and inorganic components) by establishing a resorption lacunae delimited by a circumferential actin-rich sealing zone. This sealing zone is composed of a central core, surrounded by a peripheral cloud of F-actin and is established by contacts to the matrix by integrin receptors (mainly $\alpha_v\beta_3$-, $\alpha_v\beta_1$-, $\alpha_2\beta_1$-integrins and CD44). These proteins interact with the actin cytoskeleton through the participation of actin-binding proteins (such as vinculin and paxillin). The lacunar pH is acidified to pH 4.5–4.8 through the activity of the V-ATPase which extrudes protons against their gradient and is localized at the plasma membrane of the ruffled border. Protons used for this lacunar acidification come mainly from the hydration of the metabolic CO_2 into H_2CO_3 by carbonic anhydrase 2 (CA2), and its subsequent dissociation. CA2 is found in the cytosol of the ruffled border. The proton efflux at the lacunar plasma membrane border is associated with a chloride secretion through ClC-7 channels. Organic components of the extracellular bone matrix are degraded by acid-regulated proteases such as the cathepsin K (CatK), released into the lacunae by lysosomal (Lyso) fusion, the membrane-associated MT1-MMP and the soluble MMP-9. Inorganic components of the matrix are mainly degraded by protons and lead to the release of bicarbonate (HCO_3^-) expulsed from the lacunae by the Na^+–HCO_3^- co-transporter NBCn1. The cytosolic pH is maintained between pH 6.9 and 7.2 by the functioning of the Na^+–H^+ exchanger isoform 1 (NHE1), localized at the contra-lacunar plasma membrane and adhesion sites to the matrix, and by the Cl^-/HCO_3^- anionic exchangers type 2 (AE2). The function of secondary active transporters such as NHE1 and NBCn1 is dependent on the inward Na^+ electrochemical gradient, maintained by the electrogenic Na^+/K^+ ATPase, exchanging 3 Na^+ with 2 K^+ with the hydrolysis of one ATP.

in close vicinity of podosomes and their release into the lacunae. Indeed the cytosolic CA2 has been identified to also localize in the ruffled border to produce H^+ (Lin et al., 1994). V-ATPase, the major protons extruder, is also found to be localized in osteoclast podosomes. Indeed, the a3 isoform of the V0 domain of V-ATPase, responsible for proton translocation, is found in lysosomes of osteoclasts and relocalized to plasma membranes in podosomes, along with other lysosome markers, upon osteoclast activation (Toyomura et al., 2000). Authors suggest that during the differentiation phase of osteoclasts, the a3 isoform contained in lysosomal membranes is re-localized to the ruffled border *via* the microtubule network. However V-ATPase has been observed to directly bind to F-actin (Lee et al., 1999) and, therefore, its transport to the membrane could be linked to the cytoskeleton reorganization during osteoclast activation (Chen et al., 2004; Lee et al., 1999; Zuo et al., 2006). This direct interaction with F-actin has been observed and occurs with the B subunit of the V1 domain of V-ATPase, responsible for ATP hydrolysis (Holliday et al., 2000). This might be regulated by PI3kinase, which is involved in the formation of actin rings (Chen et al., 2004). It has been also shown that NHE1, while important for osteoclast maturation and functioning, is not directly involved in lacunae acidification (Gupta et al., 1996; Henriksen et al., 2008). Indeed NHE1 is not uniformly expressed in avian osteoclasts and have a more complex distribution; it is expressed in basolateral (contra-lacunar) and also at adhesion sites to the bone matrix, corresponding to the sealing zone, where it colocalizes with integrin $\alpha_v\beta_3$ and to the focal adhesion kinase (FAK), and could therefore belong to the F-actin cloud (Fig. 1). Beside their role in proton extrusion, the involvement of NHE1 and V-ATPase in osteoclasts adhesion and migration and the link with invadosome, has not been deeply explored to date in contrast to what is known is other cell types (Stock & Schwab, 2006) and should be of great interest.

Damaging effect of acidosis on bone resorption and osteoclasts

It is well known that metabolism profoundly affects bone homeostasis, and hypoxic conditions as well as systemic and tissue acidosis lead to skeletal weakening (Arnett, 2010). While metabolic reactions in living cells produce higher proportions of acids than bases thus resulting in a reduction of pH, the pH in blood is precisely maintained, essentially thanks to the CO_2/HCO_3^- buffer and also by phosphate buffers, histidine residues of proteins such as hemoglobins which are coordinating protons. Indeed, the major causes for blood acidosis are (1) the respiratory acidosis due to insufficient CO_2 elimination by lungs and thus causing an increase in H^+ while leaving HCO_3^- concentration unaltered, and (2) the metabolic acidosis corresponding to a reduction of renal excretion of H^+ or HCO_3^- production without altering CO_2. The negative impact of systemic acidosis on bone structure was for long attributed to chemical dissolution of bone minerals by protons, until experimental acidosis *in vitro* and *in vivo* demonstrated that acids also increase the resorptive activity of osteoclasts (Arnett,

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

2010) and that the formation of resorptive pits was increased in an acidification–dependent manner and reaching a maximal effect at pH 6.8 (Arnett, 2008). This effect might be due to multiple levels of regulation. Acidosis is known to increase bone resorption through the release of Ca^{2+} from intracellular stores, in a phospholipase C (PLC)-dependent manner, which activates calcineurin and promotes the accumulation of the transcription factor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) into the nucleus, similarly to the effect of the pro-resorptive cytokine receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) (Komarova et al., 2005). Therefore it has been suggested that a proton-sensing receptor could be responsible for this effect. This receptor could be a G-protein coupled receptor expressed in bone cells such as OGR1 (ovarian cancer G protein-coupled receptor 1), which is shown to be activated by extracellular protons and to stimulate PLC and induce the signaling cascade leading to NFAT translocation (Ludwig et al., 2003). Moreover, extracellular acidification increases the expression of both CA2 (Biskobing and Fan, 2000) and the V-ATPase (Nordstrom et al., 1997), which are required for the generation and transport of protons that solubilize the bone mineral and upregulates the expression (Muzylak et al., 2007) and the activity, being maximal at acidic pH (Lecaille et al., 2002), of cathepsin K necessary for degradation of organic bone components. Taken together these data suggest that the effects of protons on bones are also osteoclast-mediated and could involve a proton-sensing receptor such as OGR1. Interestingly, H^+-gated ion channels such as TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) and ASICs (acid-sensing ion channels) are expressed by osteoclasts and could also be involved in modifying its function (Jahr et al., 2005; Rossi et al., 2009). Particularly, the use of TRPV1 agonists has been shown to increase the expression and the activity of the osteoclast biomarker TRAP and of cathepsin K (Rossi et al., 2009), while the use of the antagonist capsazepine inhibited osteoclast maturation (Idris et al., 2010). It is also important to note that a decrease of pH could occur locally at sites of inflammation and neoplasia/metastasis, which are pathological conditions often associated with an increased osteoclastic resorption (Arnett, 2010).

pH regulation in cancer cells and formation of invadopodia

Metabolic adaptation and pH regulation in adherent cancer cells

Invasive cancer cells are known to acquire various adaptive properties enabling them to live and grow independently of the presence of growth factors, to be insensitive to growth inhibitors as well as apoptotic signals and resisting to cell death (Hanahan and Weinberg, 2011). A key determinant in the tumor progression is coming from the selection of cancer cells having an adapted metabolism (Kroemer and Pouyssegur, 2008). During first phase of the carcinogenesis developing from solid tissues such as epithelial tissues, it is well known that after the initiation phase, cancer cells grow *in situ* giving rise to a dense, disorganized primary tumor. Since blood vessels are found in the underneath conjunctive tissue, cancer cells will develop in low O_2 conditions. In such hypoxic conditions, the oxidative phosphorylation is no longer allowed which causes ATP production deficiencies. These particularly stringent conditions can be lethal to rapidly proliferating cancer cells which are highly consuming high amounts of energy and could give rise to necrotic areas in tumors. In this scenario, cancer cells having an adapted anaerobic metabolism will survive and be selected giving rise to new clones (Fig. 2A). These clones exhibit a preferential glycolytic metabolism, even in the presence of oxygen, when they are reintroduced in a normoxic environment. This particularity, called "the Warburg effect" or "aerobic glycolysis", leads to the conversion of one molecule of glucose into 2 molecules of lactic acid to produce only 2 ATP – compared to the 36 ATP produced with aerobic metabolism (Ebbesen et al., 2009; Fang et al., 2008; Gatenby and Gillies, 2004; Vander Heiden et al., 2009). Therefore to maintain their energetic needs, cancer cells show a higher expression of glucose transporters (GLUT) (Macheda et al., 2005), and a higher glucose consumption than normal tissues and tumors can be imaged by following the uptake of the glucose analog tracer 18-fluorodeoxyglucose (FdG) by positron-emission tomography (PET) (Gambhir, 2002; Hawkins and Phelps, 1988; Weber et al., 1999). However, this adapted metabolism is responsible for an increased production of hydrogen ions which could be lethal for cancer cells if not counteracted. Therefore, an adaptative feature of cancer cells, and especially of highly aggressive cancer cells, is the overexpression and the increased activity of multiple pH-regulating transporters and enzymes such as V-ATPases (Fais et al., 2007), NHE exchangers (Cardone et al., 2005), carbonic anhydrases (Chiche et al., 2009; Supuran, 2008a), proton linked monocarboxylate transporters MCTs (Chiche et al., 2012; Pouyssegur et al., 2006), and Cl^-/HCO_3^- exchangers. As an example NHE1 is overexpressed in cervical cancer (Chiang et al., 2008) and hepatocellular carcinoma (Yang et al., 2010) and is correlated with clinical outcome, while its activity is upregulated in glioma (McLean et al., 2000) and breast cancer cells (Brisson et al., 2011; Reshkin et al., 2000a). Furthermore, it has been shown that transformation of cells induced an increase of NHE1 activity through a rise in the affinity of its intracellular allosteric proton-binding site for its substrate (Reshkin et al., 2000b).

While the canonoic idea is that these pH regulators lead to a dysregulated, alkalinized pHi after the hypermetabolic production of protons (pH 7.4–7.7 *versus* pH 6.9–7.2 in cancer and in normal cells, respectively), they also promote the extrusion of protons out of cancer cells and are responsible for the acidification of the extracellular space (Cardone et al., 2005) (Fig. 2A). This is responsible for a reversed pH gradient between intra and extracellular compartments as compared to normal cells (Gallagher et al., 2008; Gillies et al., 2002), which is thought to confer multiple advantages to cancer cells (Webb et al., 2011). Therefore the pharmacological targeting of these transporters has been proposed to represent a new strategy to fight against cancer (Harguindey et al., 2009; Neri and Supuran, 2011), and the International Society for Proton Dynamics in Cancer (http://www.ispdc.net), studying pH regulations in relation with metabolism in cancer, have been launched in January 2010 with the aims of increasing the understanding of H^+ dynamics in cancer research and to highlight new potential targets for inducing selective apoptosis and other therapeutic interventions in malignant tumors being resistant to conventional treatments (Huber et al., 2010). While the importance of pH regulation on cancer cell properties such as proliferation, migration, or invasiveness has been long known, the identification of pH regulators in invadopodial formation and function has been made quite recently. In the following part we will discuss the recent advances in the understanding of the involvement of pH regulators in cancer cells invasiveness through the modulation of invadopodia function.

Selective advantages of dysregulated pH for invadopodial formation and activity in cancer cells

As indicated previously, the dysregulated pH in cancer cells leads to an intracellular alkalinization (pHi >7.4) which has been shown to be favorable for cancer cell proliferation and survival (Pouyssegur et al., 1985), mainly by limiting apoptosis which is, instead, associated with an intracellular acidification (Lagadic-Gossmann et al., 2004). It has also been demonstrated that this alkaline pHi could stimulate the glycolytic metabolism by promoting the activity of glycolytic enzymes and by inhibiting gluconeogenesis (Dietl et al., 2010; Kuwata et al., 1991; Peak et al., 1992). As a result, there is the establishment of a vicious cycle:

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS
L. Brisson et al. / European Journal of Cell Biology xxx (2012) xxx–xxx

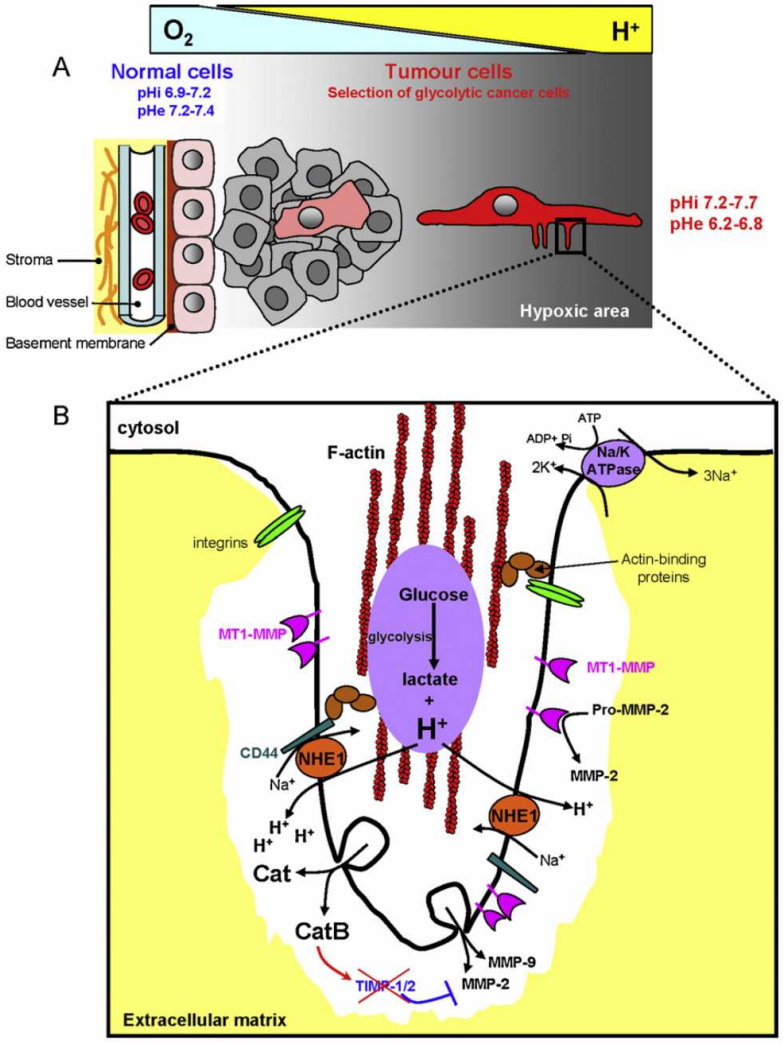


Fig. 2. Dysregulated pH in cancer progression and invadopodial functioning. (A) In solid tumors, cancer cells develop at distance from blood vessels and are exposed to hypoxic conditions, as they reach the oxygen diffusion limit. Only adapted cancer cells showing a preferential glycolytic metabolism are selected. Under low O_2 conditions, and as a consequence of glycolysis, there is a high production of protons (H^+) which are extruded leading to an extracellular acidification to pH 6.2–6.8 (compared to pH 7.2–7.4 found in normal tissues). The intracellular pHi of cancer cells is generally accepted to be alkaline to pH 7.2–7.7 compared to pH 6.9–7.2 found in normal cells. Glycolytic cancer cells become more invasive and develop invadopodia (insert) which are involved in the extracellular matrix (ECM) degradation. This is a key step in the development of metastasis. (B) Magnification of the insert in A, showing the importance of pH regulators in the functioning of a cancer cell invadopodium. Invadopodia are F-actin-enriched cellular protrusions responsible for ECM degradation. A recent study demonstrated that glycolytic enzymes are enriched into invadopodia (Attanasio et al., 2011), leading to the localized production of H^+. The extrusion of protons is mainly performed through the functioning of Na^+–H^+ exchangers type 1 (NHE1) (Busco et al., 2010). Hyaluronic acid receptors CD44 interact with NHE1 and promote their activity (Bourguignon et al., 2004). This efflux of protons leads to the peri-invadopodial acidification favorable to the activity of cystein cathepsins (Cat) released after vesicle and/or lysosome fusion. The main cathepsin to be described in cancer cell invasion being the cathepsin B (CatB). Extracellular acidification also promotes the expression and the recruitment of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP at the invadopodial site in order to remodel the ECM. MMP-2 and MMP-9 are released extracellularly while MT1-MMP is associated with the membrane and participates in the processing of inactive pro-MMP-2 into active MMP-2. Cat B is also known to promote the degradation of the endogenous MMP inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2, therefore leading to an increased proteolytic disruption of the ECM. The inward Na^+ electrochemical gradient, necessary for NHE1 functioning, is maintained by the electrogenic Na^+/K^+ ATPase.

while this increase of metabolic production is contributing to the high proliferation rate of cancer cells, needing a high consumption of energy, this is also maintaining this high production of protons that then need to be extruded.

The extrusion of protons leads to the acidification of the extracellular pH and this is known to promote cancer cell migration and degradation of the ECM through the activation of secretion and activity of proteases (Martin et al., 2011; Stock and Schwab, 2009). As such it promotes cancer cell invasiveness *in vitro* (Gillet et al., 2009; Martinez-Zaguilan et al., 1996) as well as *in vivo* metastasis (Rofstad et al., 2006), which can be prevented by increasing the extracellular pH using bicarbonates (Robey et al., 2009). Acidic pHe results in the ECM degradation and cellular invasiveness, through similar effects as those observed in osteoclast during bone remodeling, *via* the increase of protease secretion or activation (Bourguignon et al., 2004; Gillet et al., 2009; Martinez-Zaguilan et al., 1996; Rozhin et al., 1994). This is performed in focal sites corresponding to invadopodia. Extracellular acidic environment

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

surrounding the cancer cell can also trigger the direct destruction of the ECM, kill normal surrounding cells and reduce the immune response (Gatenby et al., 2006; Kraus and Wolf, 1996).

Cancer cell migration and invasiveness are known to rely on the morphological and functional polarization of cells, with an asymmetric repartition of adhesion and signaling molecules as well as ion channels and transporters (Stock and Schwab, 2009). This is particularly responsible for an intracellular gradient of protons, with the pHi at the leading edge being more alkaline than at the rear end of migrating cells (Martin et al., 2011). Moreover, this pHi gradient participates in the dynamic remodeling of the actin cytoskeleton. The alkaline pHi promotes cellular migration through pH-sensitive activation of the small GTPase CDC42 (Frantz et al., 2007; Koivusalo et al., 2010) which promotes cell polarity of migrating cells, and through the modulation of pH-sensitive actin-binding proteins stimulating the polymerization of actin filaments (Frantz et al., 2008; Grey et al., 2006; Pope et al., 2004; Srivastava et al., 2008). While most of these effects could be principally attributed to the general modulation of the intracellular pH, multiple studies have found an association of invasive properties to the overexpression and polarized localization of NHE1 (Stock et al., 2008) and to a lesser extend of V-ATPase (Hinton et al., 2009; Sennoune et al., 2004).

In breast cancer cells, the extracellular acidification (from pH 7.4 to 6.8) has been shown to increase the formation of invadopodia and the focal digestion of the ECM (Busco et al., 2010). While the involvement of NHE1 in cancer cell invasiveness and metastasis has been long known (Cardone et al., 2005), and that factors increasing their activity or expression would result in an increased invasiveness (Brisson et al., 2011), it has only recently been shown that NHE1 is expressed at the invadopodia, and is generating the extracellular acidification necessary for the localized ECM degradation (Busco et al., 2010). Hypoxic conditions, associated with tumor microenvironment, have been shown to enhance invadopodia formation and cancer cell invasiveness through the promotion of NHE1 activity (Lucien et al., 2011).

The formation and maturation of invadopodia is induced by cortactin concentration and phosphorylation which promotes the recruitment of the Nck1 adaptor protein, N-WASP, and cofilin, leading to a Arp2/3 complex-dependent actin polymerization (Desmarais et al., 2009; Oser et al., 2010). In a first stage, cortactin phosphorylation is required to release the inhibition of cofilin, which has a severing activity on actin filaments. Indeed, cortactin phosphorylation is a prerequisite for the creation of free barbed ends of actin at invadopodia. Eventually, after the formation of the barbed end, cortactin is dephosphorylated, which blocks cofilin activity, stabilizes the invadopodial structure and therefore allows the efficient degradation of the ECM (Oser et al., 2009). It has been demonstrated that cortactin phosphorylation also increases NHE1 recruitment at invadopodia (Magalhaes et al., 2011), and that local pHi alkalinization mediated by NHE1 releases cofilin from cortactin, a phenomenon which is essential for the regulation of actin polymerization and invadopodium elongation (Frantz et al., 2008). It has been demonstrated that NHE1 was generating pH fluctuations in invadopodia, compared to other cytoplasmic areas, and that this was responsible for dynamic recruitment and accumulation of cortactin and cofilin with oscillatory fluctuations in invadopodia (Magalhaes et al., 2011). This study highlights the involvement of cortactin phosphorylation, local pH changes induced by NHE1 and cofilin activation in regulation of the dynamic cycles of invadopodia protrusion and retraction. Indeed, NHE1 inhibition reduces invadopodia formation (Busco et al., 2010) and induces invadopodia disassembly (Magalhaes et al., 2011) whereas its stimulation, by serum deprivation, promotes the formation of leading edge pseudopodia and invadopodia and increases motility and invasiveness of breast cancer cells (Paradiso et al., 2004). Furthermore, NHE1 possesses actin-anchoring functions which are also regulating the cytoskeletal organization, the assembly of focal adhesions, the formation of actin stress fibers, and cell shape independently of its ion translocation function (Tominaga and Barber, 1998; Vexler et al., 1996). In breast cancer cells, NHE1 was identified as interacting with the hyaluronic acid receptor CD44 – an important component of the invadosome constitution – into caveolin-1-containing lipid rafts. This association promotes the recruitment of RhoA-activated Rho kinase which phosphorylates NHE1 and enhances its activity by promoting the efflux of protons in those membrane areas. The associated pHe acidification activates membranous hyaluronidase-2 and extracellularly secreted cathepsin B, resulting in an increased cancer cell invasion (Bourguignon et al., 2004). Altogether, these studies demonstrate that NHE1 seems to be involved in both the formation and the maturation of invadopodia, as well as their ECM degradation activity (Fig. 2B).

Proteases in invadosomes

As indicated previously, one of the specific characteristics of invadosomes, from all types of cells is their ECM proteolytic capacities *in vitro* which are fulfilled by numerous enzymes that are released from the cell or bound to the plasma membrane and exhibiting their catalytic site in the extracellular compartment. These properties are expected to participate to the ECM degradation *in vivo* which could be associated with physiological tissue remodeling and cell invasiveness. Indeed, depending on the tissue and ECM components, numerous enzymes showing substrate specificities should be involved. Therefore, three major classes of proteases could be of importance: these are the zinc-dependent matrix metalloproteinases (MMPs) and the closely related ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase); the serine proteases and the acidic cysteine cathepsins.

While these three main classes of proteases are found in invadosomes, the zinc regulated metalloproteases MMP-2, MMP-9, ADAMs and particularly the membrane-associated MT1-MMP (also known as MMP-14) have drawn the most of attention in both podosomes and invadopodia (Kelly et al., 1994; Linder et al., 2011; Monsky and Chen, 1993; Tatin et al., 2006; Wiesner et al., 2010) and MT1-MMP has been considered as an invadosome marker (Figs. 1 and 2). Serine proteases, such as seprase, have also been identified and associated with the invadosomal degrading activity (Artym et al., 2002; Ghersi et al., 2006; Kindzelskii et al., 2004; Monsky et al., 1994). Cysteine cathepsins were initially found in osteoclasts podosomes and mostly the cathepsin K was studied as it is known to be secreted into the resorption lacuna and to have a collagen I proteolytic activity (Vaananen and Laitala-Leinonen, 2008), even if other cathepsins are released (Czupalla et al., 2006). However, there is a large body of evidences that many other cystein cathepsins, including cathepsin B, could be secreted and activated within podosomes of macrophages (Lopez-Castejon et al., 2010), and invadopodia of v-Src transformed fibroblasts (Tu et al., 2008) and cancer cells (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009; Jelassi et al., 2011) and are highly involved in ECM remodeling and invasive properties. Regulators of pHi and pHe, found to be localized in the invadosome are proposed to regulate the expression, the secretion and activation of numerous proteases for the ECM remodeling.

Modulation of protease expression by pH regulators

Both the intracellular alkalinization and the extracellular acidification associated with the functioning of some pH regulators have been proposed to modulate the expression pattern of several genes including extracellular proteases (Putney and Barber, 2004). Particularly, the acidic pHe was shown to induce the expression of the

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS
L. Brisson et al. / European Journal of Cell Biology xxx (2012) xxx–xxx

type IV specific collagenase MMP-9 in melanoma cells, through the activation of phospholipase D, ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases and NFκB transcription factors (Kato et al., 2005). Correlatively, the expression of a non-transporting NHE1 mutant in fibroblasts, proposed to decrease pHi and increase pHe, has been shown to reduce the expression of MMP-9 compared to the expression of the wild-type NHE1 (Putney and Barber, 2004). Recently, the pharmacological targeting of NHE1, using cariporide, was demonstrated to decrease invasion in breast (Lin et al., 2011a) and cervical (Lin et al., 2011b) cancer cells by down regulating the expression of MT1-MMP. Since this membrane-associated protease is known to activate Pro-MMP-2 in MMP-2 in the extracellular compartment, NHE1 inhibition also reduced MMP-2 processing (Lin et al., 2011a).

The secretion of soluble proteases at invadosomes is modulated by pH regulators

Recent reviews have documented that protease delivery to invadosomes involves the trafficking of lysosomes or protease-containing vesicles *via* microtubules and kinesin motor proteins (Caldieri and Buccione, 2010; Linder, 2007; Poincloux et al., 2009). In this regard, it has been shown that changes in cytosolic pH induce the relocalization of protease-containing-lysosomes between cell center and periphery and following the distribution of microtubules in both fibroblasts and macrophages (Heuser, 1989). Also, cathepsin B-containing vesicles are more peripherally distributed and have a greater constitutive secretion in highly compared to weaker invasive cells, and that this distribution is dependent on functional microtubules (Rozhin et al., 1994). In the same study, the authors found that an extracellular acidification from pH 7.4 to 6.5 induced the relocalization of these vesicles toward the cell periphery and their secretion in a microtubule-dependent manner. Similarly, acidic pHe induces lysosomal fusion to filopodia in cancer cells as well as the number and the length of these invasion-associated cellular structures (Glunde et al., 2003). The demonstration that the acidic pHe induces cathepsin-containing lysosomal fusion specifically to invadopodia resulting in an increased cathepsin B release into the extracellular environment and ECM proteolysis came later from studies performed in v-src transformed fibroblasts (Tu et al., 2008) and in prostate cancer cells (Steffan et al., 2009). This lysosomal trafficking which involved the PI3K pathway, RhoA GTPase and required microtubules, was prevented by the inhibition of either NHE1 or NHE3, using cariporide and S3226, respectively, but not by the inhibition of V-ATPase using Bafilomycin A1 (Steffan et al., 2009). The same authors demonstrated that the hepatocyte growth factor (HGF) stimulated the release of cathepsin B, through similar pathways, by stimulating NHE1 and NHE3 proton efflux activity (Steffan et al., 2010). This mechanism of cathepsin-containing lysosomes targeted to invadosome, to promote matrix degradation, is not restricted to cancer cells as similar mechanisms have been observed in osteoclasts, in which cathepsin K is trafficked to podosomes *via* lysosomes (Blair et al., 1989; Toyomura et al., 2003; Zhao et al., 2002), and in phagocytes where lysosomal proteins such as Hematopoietic cell kinase (Hck) isoform p61Hck, LYAAT or CD36 are found in podosomes and participate to their biogenesis (Carreno et al., 2000; Cougoule et al., 2005; Poincloux et al., 2006).

As demonstrated previously, the activity of cortactin on invadopodium elongation and maturation is highly modulated by pHi, and mostly by the activity of NHE1. Besides the involvement of cortactin in actin remodeling, it also promotes the secretion of MMP-2 and MMP-9 as well as the MT1-MMP plasma membrane trafficking into invadopodia of squamous cell carcinoma (Clark and Weaver, 2008; Clark et al., 2007). Importantly, MMP inhibition decreased both ECM degradation and the number of invadopodia. While these results underline the importance of matrix degradation in and for invadopodia functioning, they also suggest that some products released after ECM-degradation could also promote, through still unidentified pathways, the intracellularly mediated initiation and extension of invadopodia. This positive feedback loop hypothesis would be supported by the finding that depletion of MT1-MMP or inhibition of MMPs activity decreased the formation of actin and cortactin-rich regions at the ventral surface of melanoma and breast cancer cells (Ayala et al., 2008; Sakurai-Yageta et al., 2008; Steffen et al., 2008).

Protease activation by pH regulators at extracellular sites of invadosomes

All soluble MMPs are synthesized as inactive zymogens with a pro-peptide domain hiding the catalytic site. MMPs are generally secreted in extracellular medium where they are activated by pro-peptide cleavage in order to degrade their ECM substrate (Birkedal-Hansen et al., 1993; Ra and Parks, 2007). Membrane-associated MMPs, called MT-MMPs, are able to exert their activity and keep this restrained to specific extracellular regions, compared to secreted proteases which can potentially act in the entire extracellular environment. Among all membrane-associated MMPs, MT1-MMP is known to be enriched in invadosome and is able to activate other proteases, such as MMP2 to promote collagen IV degradation at sites of invadopodia (Deryugina et al., 2001). As already discussed, since both expression and delivery of MT1-MMP is pH dependent, there is, therefore, an indirect pH-dependent activation of gelatinase activity at the invadosome site.

Cathepsins are subdivided in three groups according to the amino acids involved in the catalytic site: cysteine, aspartyl and serine cathepsins. In contrast with serine proteases which have a maximal activity at neutral and mildly alkaline pH 8, most of the cysteine cathepsins have their optimal activity at acidic pH between 5 and 6 (Barrett et al., 1981) and that at neutral and alkaline pH are quickly inactivated, with the exception of cathepsin S which retains its activity (Kirschke et al., 1989; Turk et al., 1993). While cysteine cathepsins were initially found to be localized in lysosomes and endosomes where the acidic pH is favorable for their activity, they are also found to be extracellularly secreted and active (Brix et al., 2008; Lecaille et al., 2008). Among all cysteine cathepsins, the cathepsins B, L and H are the most studied in cancer and their increased expression or activity is generally associated with a poor prognosis (Mohamed and Sloane, 2006; Palermo and Joyce, 2008). At the cellular level they are released by cancer cells (Gillet et al., 2009; Jelassi et al., 2011) and their activity is enhanced by the acidic pHe due to NHE1 functioning, especially in particular areas such as the extracellular sites of caveolae (Bourguignon et al., 2004; Brisson et al., 2011). Besides their role in matrix degradation, cathepsins are also involved in the processing of other proteases. Cathepsin B and L are involved in the activation of pro-cathepin D (aspartic cathepsin) in mature form (Liaudet-Coopman et al., 2006). Extracellular cathepsins B can also generate active urokinase-type plasminogen activator (uPA) (Guo et al., 2002), which can, in turn, activate pro-cathepsin B to form a positive feedback loop (Dalet-Fumeron et al., 1993). Cathepsin B is also known to promote the degradation of the endogenous MMP inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 (Kostoulas et al., 1999). Therefore the favorable acidic extracellular pH for cathepsin activity can promote the establishment of a cascade of proteases activation.

Conclusions and perspectives

Podosomes and invadopodia are both structures involved in physiological and cancerous-associated matrix remodeling and whose formation, maturation and function are highly dependent on intracellular and extracellular pH. It is important to note that while

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

the cellular effects of a modulated pH could be attributed to protonation/deprotonation of residues of proteins involved in multiple signaling pathways, the result of both extracelluar acidification and intracellular alkalinization is the formation and maturation of invadosome. This occurs thanks to the existence of pH gradients inside and outside the cells, dictated by the focal expression of some pH regulators such NHE1 and H^+-ATPases in invadosomes. As these proton extruders are localized in specific cellular areas involved in matrix degradation, it can also be hypothesized that metabolic producers of protons could be colocalized in such areas. Interestingly, CA2, the main proton producer in osteoclasts, while being soluble in the cytosol has been identified to also localize mainly in the ruffled border (Lin et al., 1994). Also, in hypoxic conditions which are situations often found in the tumor microenvironment, there is the enhancement of invadopodia formation and the increase of the associated invasiveness in cancer cells, through the promotion of NHE1 activity (Lucien et al., 2011). Moreover, two studies demonstrated that glycolytic enzymes are enriched into invadopodia (Attanasio et al., 2011; Nguyen et al., 2000). These recent studies provide new insights on the link between cell metabolism and the resulting effects on extracellular pH and ECM degradation at the invadosome site. Indeed, it could be postulated that the invadosomes function as specialized cytosolic and membrane scaffolding zones, linking metabolic enzymes and, therefore, proton producers, to pH extruders and protease activity to promote ECM degradation and subsequent invasion. Meanwhile, the ATP produced locally could be used for the energy-demanding processes involved in cytoskeleton and membrane remodeling, secretion/endocytic cycles and even for the functioning of pH regulators either directly (as in the case of V-ATPases) or indirectly (as in the case of NHE1, which requires the Na^+ gradient to be maintained by Na^+/K^+ ATPases) (Figs. 1 and 2).

The knowledge of proteins involved in invadosomal functioning, and particularly proteases and pH transporters, has provided new pharmacological areas for the treatment of bone pathologies and cancer progression. First efforts were made at inhibiting protease activities (Bromme and Lecaille, 2009; Coussens et al., 2002; Palermo and Joyce, 2008). Indeed MMP inhibitors were early used in cancer treatment but have been unsuccessful to date because of limited efficacy or severe side effects probably due to insufficient specificity of inhibitors tested (Coussens et al., 2002). The only MMP inhibitor approved by the Food and Drug Administration (FDA) to date is a chemically modified tetracycline without antibiotic activities, used for the prevention of periodontitis and currently in clinical trial for Kaposi's sarcoma and brain tumors (Sapadin and Fleischmajer, 2006). Development of more specific protease inhibitors or their delivery to targeted areas could be necessary to use such agents as clinical drugs. Another opportunity would be to target pH regulators and this has been investigated in osteoporosis and cancer treatment (Neri and Supuran, 2011). Among these are inhibitors of the carbonic anhydrases which are currently undergoing clinical trials for several cancers (Supuran, 2008a). Proton pump inhibitors of the omeprazole type are widely used for clinical treatment of cancers (De Milito et al., 2010; Spugnini et al., 2010). These compounds are mainly prodrugs that are activated in the acidic vicinity of tumors in order to target V-ATPase of cancer cells. Another approach would be to neutralize the pH in tumor tissues as it has been realized with the oral administration of bicarbonates in a mouse model of metastatic breast cancer to reduce the formation of spontaneous metastases (Robey et al., 2009). V-ATPase targeting has also been proposed to provide new therapeutic strategies in bone resorption diseases such as osteoporosis (Farina and Gagliardi, 2002; Yuan et al., 2010). Recently, the use of NHE1 inhibitors in cancer therapy has been discussed (Stock et al., 2012).

Acknowledgments

We acknowledge the "Ligue Nationale Contre le Cancer – Région Grand-Ouest", the "Fondation pour la Recherche Médicale – Comité Touraine" and the "Association CANCEN" for their financial support to SR and to the "Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro" (AIRC) Grant #5167 for SJR. Lucie Brisson was funded by a PhD Grant from the "Région Centre" and had a travel Grant from the University François-Rabelais of Tours to visit and perform experiments in S. Reshkin's lab.

References

al-Baldawi, N.F., Abercrombie, R.F., 1992. Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient. Biophys. J. 61, 1470–1479.
Alexander, N.R., Branch, K.M., Parekh, A., Clark, E.S., Iwueke, I.C., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2008. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. Curr. Biol. 18, 1295–1299.
Andersen, T.L., del Carmen Ovejero, M., Kirkegaard, T., Lenhard, T., Foged, N.T., Delaisse, J.M., 2004. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. Bone 35, 1107–1119.
Arnett, T.R., 2008. Extracellular pH regulates bone cell function. J. Nutr. 138, 415S–418S.
Arnett, T.R., 2010. Acidosis, hypoxia and bone. Arch. Biochem. Biophys. 503, 103–109.
Artym, V.V., Kindzelskii, A.L., Chen, W.T., Petty, H.R., 2002. Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. Carcinogenesis 23, 1593–1601.
Artym, V.V., Matsumoto, K., Mueller, S.C., Yamada, K.M., 2011. Dynamic membrane remodeling at invadopodia differentiates invadopodia from podosomes. Eur. J. Cell Biol. 90, 172–180.
Attanasio, F., Caldieri, G., Giacchetti, G., van Horssen, R., Wieringa, B., Buccione, R., 2011. Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. Eur. J. Cell Biol. 90, 115–127.
Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., Buccione, R., 2006. Invadopodia: a guided tour. Eur. J. Cell Biol. 85, 159–164.
Ayala, I., Baldassarre, M., Giacchetti, G., Caldieri, G., Tete, S., Luini, A., Buccione, R., 2008. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. J. Cell Sci. 121, 369–378.
Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M.A., Luini, A., Buccione, R., 2003. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. Mol. Biol. Cell 14, 1074–1084.
Baron, R., 1989. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. Anat. Rec. 224, 317–324.
Baron, R., Neff, L., Louvard, D., Courtoy, P.J., 1985. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. J. Cell Biol. 101, 2210–2222.
Barrett, A.J., Kirschke, H., 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol. 80 (Pt C), 535–561.
Beyenbach, K.W., Wieczorek, H., 2006. The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J. Exp. Biol. 209, 577–589.
Bierman, A.J., Cragoe Jr., E.J., de Laat, S.W., Moolenaar, W.H., 1988. Bicarbonate determines cytoplasmic pH and suppresses mitogen-induced alkalinization in fibroblastic cells. J. Biol. Chem. 263, 15253–15256.
Binks, M., Jones, G.E., Brickell, P.M., Kinnon, C., Katz, D.R., Thrasher, A.J., 1998. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott–Aldrich syndrome. Eur. J. Immunol. 28, 3259–3267.
Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., 1993. Matrix metalloproteinases: a review. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4, 197–250.
Biskobing, D.M., Fan, D., 2000. Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. Calcif. Tissue Int. 67, 178–183.
Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Ghiselli, R., Gluck, S., 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science 245, 855–857.
Bodin, P., Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATP release. Neurochem. Res. 26, 959–969.
Boron, W.F., 1986. Intracellular pH regulation in epithelial cells. Annu. Rev. Physiol. 48, 377–388.
Boron, W.F., 2004. Regulation of intracellular pH. Adv. Physiol. Educ. 28, 160–179.
Bourguignon, L.Y., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., Gilad, E., 2004. CD44 interaction with Na^+–H^+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. J. Biol. Chem. 279, 26991–27007.
Bouyer, P., Sakai, H., Itokawa, T., Kawano, T., Fulton, C.M., Boron, W.F., Insogna, K.L., 2007. Colony-stimulating factor-1 increases osteoclast intracellular pH and promotes survival via the electroneutral Na/HCO3 cotransporter NBCn1. Endocrinology 148, 831–840.
Bowden, E.T., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K.M., Mueller, S.C., 2006. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. Exp. Cell Res. 312, 1240–1253.

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J.Y., Roger, S., Gore, J., 2011. Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. Oncogene 30, 2070–2076.
Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., Jordans, S., 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. Biochimie 90, 194–207.
Bromme, D., Lecaille, F., 2009. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. Expert Opin. Investig. Drugs 18, 585–600.
Buccione, R., Orth, J.D., McNiven, M.A., 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 647–657.
Burgstaller, G., Gimona, M., 2005. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288, H3001–H3005.
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., Reshkin, S.J., 2010. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. FASEB J.
Caldieri, G., Buccione, R., 2010. Aiming for invadopodia: organizing polarized delivery at sites of invasion. Trends Cell Biol. 20, 64–70.
Calle, Y., Jones, G.E., Jagger, C., Fuller, K., Blundell, M.P., Chow, J., Chambers, T., Thrasher, A.J., 2004. WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. Blood 103, 3552–3561.
Cardone, R.A., Casavola, V., Reshkin, S.J., 2005. The role of disturbed pH dynamics and the Na^+/H^+ exchanger in metastasis. Nat. Rev. Cancer 5, 786–795.
Carreno, S., Gouze, M.E., Schaak, S., Emorine, L.J., Maridonneau-Parini, I., 2000. Lack of palmitoylation redirects p59Hck from the plasma membrane to p61Hck-positive lysosomes. J. Biol. Chem. 275, 36223–36229.
Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J., 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 50–61.
Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M., Saltel, F., 2007. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. Mol. Biol. Cell 18, 4899–4910.
Chen, S.H., Bubb, M.R., Yarmola, E.G., Zuo, J., Jiang, J., Lee, B.S., Lu, M., Gluck, S.L., Hurst, I.R., Holliday, L.S., 2004. Vacuolar H^+-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. J. Biol. Chem. 279, 7988–7998.
Chen, W.T., 1989. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. J. Exp. Zool. 251, 167–185.
Chiang, Y., Chou, C.Y., Hsu, K.F., Huang, Y.F., Shen, M.R., 2008. EGF upregulates Na^+/H^+ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. J. Cell. Physiol. 214, 810–819.
Chiche, J., Fur, Y.L., Vilmen, C., Frassineti, F., Daniel, L., Halestrap, A.P., Cozzone, P.J., Pouyssegur, J., Lutz, N.W., 2012. In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. Int. J. Cancer 130, 1511–1520.
Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., 2009. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. Cancer Res. 69, 358–368.
Clark, E.S., Weaver, A.M., 2008. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. Eur. J. Cell Biol. 87, 581–590.
Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., Weaver, A.M., 2007. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. Cancer Res. 67, 4227–4235.
Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., Planus, E., 2006. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. J. Cell Sci. 119, 1914–1925.
Coopman, P.J., Do, M.T., Thompson, E.W., Mueller, S.C., 1998. Phagocytosis of cross-linked gelatin matrix by human breast carcinoma cells correlates with their invasive capacity. Clin. Cancer Res. 4, 507–515.
Cordat, E., Casey, J.R., 2009. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. Biochem. J. 417, 423–439.
Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2005. Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. Traffic 6, 682–694.
Coussens, L.M., Fingleton, B., Matrisian, L.M., 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science 295, 2387–2392.
Czupalla, C., Mansukoski, H., Riedl, T., Thiel, D., Krause, E., Hoflack, B., 2006. Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism. Mol. Cell. Proteomics 5, 134–143.
Dalet-Fumeron, V., Guinec, N., Pagano, M., 1993. In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases: leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator. FEBS Lett. 332, 251–254.
David-Pfeuty, T., Singer, S.J., 1980. Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 6687–6691.
De Milito, A., Canese, R., Marino, M.L., Borghi, M., Iero, M., Villa, A., Venturi, G., Lozupone, F., Iessi, E., Logozzi, M., Della Mina, P., Santinami, M., Rodolfo, M., Podo, F., Rivoltini, L., Fais, S., 2010. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. Int. J. Cancer 127, 207–219.
Delaisse, J.M., Engsig, M.T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L., Vu, T.H., Werb, Z., Winding, B., Lochter, A., Karsdal, M.A., Troen, T., Kirkegaard, T., Lenhard, T., Heegaard, A.M., Neff, L., Baron, R., Foged, N.T., 2000. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. Clin. Chim. Acta 291, 223–234.
Denker, S.P., Barber, D.L., 2002. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na–H exchanger NHE1. J. Cell Biol. 159, 1087–1096.
Denker, S.P., Huang, D.C., Orlowski, J., Furthmayr, H., Barber, D.L., 2000. Direct binding of the Na–H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. Mol. Cell 6, 1425–1436.
Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W., Strongin, A.Y., 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. Exp. Cell Res. 263, 209–223.
Desmarais, V., Yamaguchi, H., Oser, M., Soon, L., Mouneimne, G., Sarmiento, C., Eddy, R., Condeelis, J., 2009. N-WASP and cortactin are involved in invadopodium-dependent chemotaxis to EGF in breast tumor cells. Cell Motil. Cytoskeleton 66, 303–316.
Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., Bard, F., 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. Mol. Biol. Cell 14, 407–416.
Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L.A., Oefner, P.J., Andreesen, R., Gottfried, E., Kreutz, M.P., 2010. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. J. Immunol. 184, 1200–1209.
Ebbesen, P., Pettersen, E.O., Gorr, T.A., Jobst, G., Williams, K., Kieninger, J., Wenger, R.H., Pastorekova, S., Dubois, L., Lambin, P., Wouters, B.G., Van Den Beucken, T., Supuran, C.T., Poellinger, L., Ratcliffe, P., Kanopka, A., Gorlach, A., Gasmann, M., Harris, A.L., Maxwell, P., Scozzafava, A., 2009. Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 24 (Suppl. 1), 1–39.
Fais, S., De Milito, A., You, H., Qin, W., 2007. Targeting vacuolar H^+-ATPases as a new strategy against cancer. Cancer Res. 67, 10627–10630.
Fang, J.S., Gillies, R.D., Gatenby, R.A., 2008. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. Semin. Cancer Biol. 18, 330–337.
Farina, C., Gagliardi, S., 2002. Selective inhibition of osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. Curr. Pharm. Des. 8, 2033–2048.
Forgac, M., 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 917–929.
Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M.J., Jacobson, M.P., 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.
Frantz, C., Karydis, A., Nalbant, P., Hahn, K.M., Barber, D.L., 2007. Positive feedback between Cdc42 activity and H^+ efflux by the Na–H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells. J. Cell Biol. 179, 403–410.
Friedl, P., Alexander, S., 2011. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. Cell 147, 992–1009.
Gallagher, F.A., Kettunen, M.I., Day, S.E., Hu, D.E., Ardenkjaer-Larsen, J.H., Zandt, R., Jensen, P.R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M.H., Brindle, K.M., 2008. Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized 13C-labelled bicarbonate. Nature 453, 940–943.
Gambhir, S.S., 2002. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. Nat. Rev. Cancer 2, 683–693.
Gatenby, R.A., Gawlinski, E.T., Gmitro, A.F., Kaylor, B., Gillies, R.J., 2006. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. Cancer Res. 66, 5216–5223.
Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat. Rev. Cancer 4, 891–899.
Gay, C.V., Mueller, W.J., 1974. Carbonic anhydrase and osteoclasts: localization by labeled inhibitor autoradiography. Science 183, 432–434.
Ghersi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., Chen, W.T., 2006. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. Cancer Res. 66, 4652–4661.
Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., 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.
Gillies, R.J., Raghunand, N., Karczmar, G.S., Bhujwalla, Z.M., 2002. MRI of the tumor microenvironment. J. Magn. Reson. Imaging 16, 430–450.
Glunde, K., Guggino, S.E., Solaiyappan, M., Pathak, A.P., Ichikawa, Y., Bhujwalla, Z.M., 2003. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. Neoplasia 5, 533–545.
Gonda, T., Maouyo, D., Rees, S.E., Montrose, M.H., 1999. Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid. Am. J. Physiol. 276, G259–G270.
Grey, M.J., Tang, Y., Alexov, E., McKnight, C.J., Raleigh, D.P., Palmer 3rd., A.G., 2006. Characterizing a partially folded intermediate of the villin headpiece domain under non-denaturing conditions: contribution of His41 to the pH-dependent stability of the N-terminal subdomain. J. Mol. Biol. 355, 1078–1094.
Guo, M., Mathieu, P.A., Linebaugh, B., Sloane, B.F., Reiners Jr., J.J., 2002. Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-betaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. J. Biol. Chem. 277, 14829–14837.
Gupta, A., Edwards, J.C., Hruska, K.A., 1996. Cellular distribution and regulation of NHE-1 isoform of the NA–H exchanger in the avian osteoclast. Bone 18, 87–95.
Hall, T.J., Chambers, T.J., 1989. Optimal bone resorption by isolated rat osteoclasts requires chloride/bicarbonate exchange. Calcif. Tissue Int. 45, 378–380.

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

G Model
EJCB-50682; No. of Pages 14
ARTICLE IN PRESS

Hall, T.J., Chambers, T.J., 1990. Na^+/H^+ antiporter is the primary proton transport system used by osteoclasts during bone resorption. J. Cell. Physiol. 142, 420–424.
Hall, T.J., Schaeublin, M., Chambers, T.J., 1992. $Na^+/H(+)$-antiporter activity is essential for the induction, but not the maintenance of osteoclastic bone resorption and cytoplasmic spreading. Biochem. Biophys. Res. Commun. 188, 1097–1103.
Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674.
Harguindey, S., Arranz, J.L., Wahl, M.L., Orive, G., Reshkin, S.J., 2009. Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. Anticancer Res. 29, 2127–2136.
Hawkins, R.A., Phelps, M.E., 1988. PET in clinical oncology. Cancer Metastasis Rev. 7, 119–142.
Henriksen, K., Sorensen, M.G., Jensen, V.K., Dziegiel, M.H., Nosjean, O., Karsdal, M.A., 2008. Ion transporters involved in acidification of the resorption lacuna in osteoclasts. Calcif. Tissue Int. 83, 230–242.
Heuser, J., 1989. Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. J. Cell Biol. 108, 855–864.
Hinton, A., Bond, S., Forgac, M., 2009. V-ATPase functions in normal and disease processes. Pflugers Arch. 457, 589–598.
Holliday, L.S., Lu, M., Lee, B.S., Nelson, R.D., Solivan, S., Zhang, L., Gluck, S.L., 2000. The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H^+-ATPase contains a filamentous actin binding site. J. Biol. Chem. 275, 32331–32337.
Huber, V., De Milito, A., Harguindey, S., Reshkin, S.J., Wahl, M.L., Rauch, C., Chiesi, A., Pouyssegur, J., Gatenby, R.A., Rivoltini, L., Fais, S., 2010. Proton dynamics in cancer. J. Transl. Med. 8, 57.
Idris, A.I., Landao-Bassonga, E., Ralston, S.H., 2010. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. Bone 46, 1089–1099.
Jahr, H., van Driel, M., van Osch, G.J., Weinans, H., van Leeuwen, J.P., 2005. Identification of acid-sensing ion channels in bone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 337, 349–354.
Jelassi, B., Chantome, A., Alcaraz-Perez, F., Baroja-Mazo, A., Cayuela, M.L., Pelegrin, P., Surprenant, A., Roger, S., 2011. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. Oncogene 30, 2108–2122.
Josephsen, K., Praetorius, J., Frische, S., Gawenis, L.R., Kwon, T.H., Agre, P., Nielsen, S., Fejerskov, O., 2009. Targeted disruption of the Cl-/HCO_3-exchanger Ae2 results in osteopetrosis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 1638–1641.
Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., Destaing, O., 2006. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. Eur. J. Cell Biol. 85, 195–202.
Kajiya, H., Okamoto, F., Fukushima, H., Okabe, K., 2003. Calcitonin inhibits proton extrusion in resorbing rat osteoclasts via protein kinase A. Pflugers Arch. 445, 651–658.
Kato, Y., Lambert, C.A., Colige, A.C., Mineur, P., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J.M., Baba, M., Hata, R., Miyazaki, K., Tsukuda, M., 2005. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. J. Biol. Chem. 280, 10938–10944.
Kelly, T., Mueller, S.C., Yeh, Y., Chen, W.T., 1994. Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. J. Cell. Physiol. 158, 299–308.
Kindzelskii, A.L., Amhad, I., Keller, D., Zhou, M.J., Haugland, R.P., Garni-Wagner, B.A., Gyetko, M.R., Todd 3rd., R.F., Petty, H.R., 2004. Pericellular proteolysis by leukocytes and tumor cells on substrates: focal activation and the role of urokinase-type plasminogen activator. Histochem. Cell Biol. 121, 299–310.
Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., Rinne, A., 1989. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. Biochem. J. 264, 467–473.
Klein, M., Seeger, P., Schuricht, B., Alper, S.L., Schwab, A., 2000. Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(−)/HCO (3)(−) exchangers in migrating renal epithelial cells. J. Gen. Physiol. 115, 599–608.
Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., Grinstein, S., 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. J. Cell Biol. 188, 547–563.
Komarova, S.V., Pereverzev, A., Shum, J.W., Sims, S.M., Dixon, S.J., 2005. Convergent signaling by acidosis and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) on the calcium/calcineurin/NFAT pathway in osteoclasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 2643–2648.
Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., Jentsch, T.J., 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. Cell 104, 205–215.
Kornak, U., Schulz, A., Friedrich, W., Uhlhaas, S., Kremens, B., Voit, T., Hasan, C., Bode, U., Jentsch, T.J., Kubisch, C., 2000. Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. Hum. Mol. Genet. 9, 2059–2063.
Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H., Baici, A., 1999. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. FEBS Lett. 455, 286–290.
Kraus, M., Wolf, B., 1996. Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. Tumour Biol. 17, 133–154.
Kroemer, G., Pouyssegur, J., 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell. 13, 472–482.
Kuwata, F., Suzuki, N., Otsuka, K., Taguchi, M., Sasai, Y., Wakino, H., Ito, M., Ebihara, S., Suzuki, K., 1991. Enzymatic regulation of glycolysis and gluconeogenesis in rabbit periodontal ligament under various physiological pH conditions. J. Nihon Univ. Sch. Dent. 33, 81–90.
Lagadic-Gossmann, D., Huc, L., Lecureur, V., 2004. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. Cell Death Differ. 11, 953–961.
Lagana, A., Vadnais, J., Le, P.U., Nguyen, T.N., Laprade, R., Nabi, I.R., Noel, J., 2000. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. J. Cell Sci. 113 (Pt 20), 3649–3662.
Laitala, T., Vaananen, H.K., 1994. Inhibition of bone resorption in vitro by antisense RNA and DNA molecules targeted against carbonic anhydrase II or two subunits of vacuolar H(+)-ATPase. J. Clin. Invest. 93, 2311–2318.
Laitala, T., Vaananen, K., 1993. Proton channel part of vacuolar H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II expression is stimulated in resorbing osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 8, 119–126.
Lakkakorpi, P.T., Helfrich, M.H., Horton, M.A., Vaananen, H.K., 1993. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, alpha v beta 3, in osteoclasts. A study using confocal laser scanning microscopy. J. Cell Sci. 104 (Pt 3), 663–670.
Lakkakorpi, P.T., Vaananen, H.K., 1996. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. Microsc. Res. Tech. 33, 171–181.
Landau, M., Herz, K., Padan, E., Ben-Tal, N., 2007. Model structure of the Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. J. Biol. Chem. 282, 37854–37863.
Lecaille, F., Bromme, D., Lalmanach, G., 2008. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. Biochimie 90, 208–226.
Lecaille, F., Kaleta, J., Bromme, D., 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chem. Rev. 102, 4459–4488.
Lee, B.S., Gluck, S.L., Holliday, L.S., 1999. Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. J. Biol. Chem. 274, 29164–29171.
Lee, S.H., Kima, T., Park, E.S., Yang, S., Jeong, D., Choi, Y., Rho, J., 2008. NHE10, a novel osteoclast-specific member of the Na^+/H^+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369, 320–326.
Lees, R.L., Sabharwal, V.K., Heersche, J.N., 2001. Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. Bone 28, 187–194.
Lehenkari, P.P., Laitala-Leinonen, T., Linna, T.J., Vaananen, H.K., 1997. The regulation of pHi in osteoclasts is dependent on the culture substrate and on the stage of the resorption cycle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 838–844.
Li, Y.P., Chen, W., Liang, Y., Li, E., Stashenko, P., 1999. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. Nat. Genet. 23, 447–451.
Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H., Vignon, F., 2006. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. Cancer Lett. 237, 167–179.
Lin, H.M., Nakamura, H., Noda, T., Ozawa, H., 1994. Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. Calcif. Tissue Int. 55, 38–45.
Lin, Y., Chang, G., Wang, J., Jin, W., Wang, L., Li, H., Ma, L., Li, Q., Pang, T., 2011a. NHE1 mediates MDA-MB-231 cells invasion through the regulation of MT1-MMP. Exp. Cell Res. 317, 2031–2040.
Lin, Y., Wang, J., Jin, W., Wang, L., Li, H., Ma, L., Li, Q., Pang, T., 2011b. NHE1 mediates migration and invasion of HeLa cells via regulating the expression and localization of MT1-MMP. Cell Biochem. Funct.
Linder, S., 2007. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 17, 107–117.
Linder, S., 2009. Invadosomes at a glance. J. Cell Sci. 122, 3009–3013.
Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M., 1999. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9648–9653.
Linder, S., Wiesner, C., Himmel, M., 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 185–211.
Lopez-Castejon, G., Theaker, J., Pelegrin, P., Clifton, A.D., Braddock, M., Surprenant, A., 2010. P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. J. Immunol. 185, 2611–2619.
Lucien, F., Brochu-Gaudreau, K., Arsenault, D., Harper, K., Dubois, C.M., 2011. Hypoxia-induced invadopodia formation involves activation of NHE-1 by the p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK). PLoS One 6, e28851.
Ludwig, M.G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J.A., Jones, C.E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R.M., Seuwen, K., 2003. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. Nature 425, 93–98.
Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B., Addadi, L., 2007. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. PLoS One 2, e179.
Macheda, M.L., Rogers, S., Best, J.D., 2005. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. J. Cell. Physiol. 202, 654–662.
Madshus, I.H., 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. Biochem. J. 250, 1–8.
Magalhaes, M.A., Larson, D.R., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Gil-Henn, H., Oser, M., Chen, X., Koleske, A.J., Condeelis, J., 2011. Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway. J. Cell Biol. 195, 903–920.
Malo, M.E., Fliegel, L., 2006. Physiological role and regulation of the Na^+/H^+ exchanger. Can. J. Physiol. Pharmacol. 84, 1081–1095.
Martin, C., Pedersen, S.F., Schwab, A., Stock, C., 2011. Intracellular pH gradients in migrating cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 300, C490–C495.

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Chu, Y.W., Gillies, R.J., Hendrix, M.J., 1996. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. Clin. Exp. Metastasis 14, 176–186.
Mattsson, J.P., Schlesinger, P.H., Keeling, D.J., Teitelbaum, S.L., Stone, D.K., Xie, X.S., 1994. Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membranes. J. Biol. Chem. 269, 24979–24982.
Mattsson, J.P., Skyman, C., Palokangas, H., Vaananen, K.H., Keeling, D.J., 1997. Characterization and cellular distribution of the osteoclast ruffled membrane vacuolar H^+-ATPase B-subunit using isoform-specific antibodies. J. Bone Miner. Res. 12, 753–760.
McLean, L.A., Roscoe, J., Jorgensen, N.K., Gorin, F.A., Cala, P.M., 2000. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278, C676–C688.
Messier, J.M., Shaw, L.M., Chafel, M., Matsudaira, P., Mercurio, A.M., 1993. Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. Cell Motil. Cytoskeleton 25, 223–233.
Mohamed, M.M., Sloane, B.F., 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. Nat. Rev. Cancer 6, 764–775.
Monsky, W.L., Chen, W.T., 1993. Proteases of cell adhesion proteins in cancer. Semin. Cancer Biol. 4, 251–258.
Monsky, W.L., Lin, C.Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S.K., Mueller, S.C., Chen, W.T., 1994. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. Cancer Res. 54, 5702–5710.
Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., Genot, E., 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. Mol. Cell. Biol. 23, 6809–6822.
Mueller, S.C., Chen, W.T., 1991. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. J. Cell Sci. 99 (Pt 2), 213–225.
Murphy, D.A., Courtneidge, S.A., 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 413–426.
Muzylak, M., Arnett, T.R., Price, J.S., Horton, M.A., 2007. The in vitro effect of pH on osteoclasts and bone resorption in the cat: implications for the pathogenesis of FORL. J. Cell. Physiol. 213, 144–150.
Nakamura, I., Pilkington, M.F., Lakkakorpi, P.T., Lipfert, L., Sims, S.M., Dixon, S.J., Rodan, G.A., Duong, L.T., 1999. Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. J. Cell Sci. 112 (Pt 22), 3985–3993.
Neri, D., Supuran, C.T., 2011. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. Nat. Rev. Drug Discov. 10, 767–777.
Nguyen, T.N., Wang, H.J., Zalzal, S., Nanci, A., Nabi, I.R., 2000. Purification and characterization of beta-actin-rich tumor cell pseudopodia: role of glycolysis. Exp. Cell Res. 258 (1), 171–183.
Nordstrom, T., Rotstein, O.D., Romanek, R., Asotra, S., Heersche, J.N., Manolson, M.F., Brisseau, G.F., Grinstein, S., 1995. Regulation of cytoplasmic pH in osteoclasts. Contribution of proton pumps and a proton-selective conductance. J. Biol. Chem. 270, 2203–2212.
Nordstrom, T., Shrode, L.D., Rotstein, O.D., Romanek, R., Goto, T., Heersche, J.N., Manolson, M.F., Brisseau, G.F., Grinstein, S., 1997. Chronic extracellular acidosis induces plasmalemmal vacuolar type H^+ ATPase activity in osteoclasts. J. Biol. Chem. 272, 6354–6360.
Oreffo, R.O., Teti, A., Triffitt, J.T., Francis, M.J., Carano, A., Zallone, A.Z., 1988. Effect of vitamin A on bone resorption: evidence for direct stimulation of isolated chicken osteoclasts by retinol and retinoic acid. J. Bone Miner. Res. 3, 203–210.
Orlowski, J., Grinstein, S., 1997. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells. J. Biol. Chem. 272, 22373–22376.
Orlowski, J., Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. Pflugers Arch. 447, 549–565.
Oser, M., Mader, C.C., Gil-Henn, H., Magalhaes, M., Bravo-Cordero, J.J., Koleske, A.J., Condeelis, J., 2010. Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. J. Cell Sci. 123, 3662–3673.
Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., 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.
Osiak, A.E., Zenner, G., Linder, S., 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. Exp. Cell Res. 307, 342–353.
Palermo, C., Joyce, J.A., 2008. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. Trends Pharmacol. Sci. 29, 22–28.
Paradiso, A., Cardone, R.A., Bellizzi, A., Bagorda, A., Guerra, L., Tommasino, M., Casavola, V., Reshkin, S.J., 2004. The Na^+–H^+ exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. Breast Cancer Res. 6, R616–R628.
Parekh, A., Ruppender, N.S., Branch, K.M., Sewell-Loftin, M.K., Lin, J., Boyer, P.D., Candiello, J.E., Merryman, W.D., Guelcher, S.A., Weaver, A.M., 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. Biophys. J. 100, 573–582.
Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 19, 199–229.
Patel, H., Barber, D.L., 2005. A developmentally regulated Na–H exchanger in *Dictyostelium discoideum* is necessary for cell polarity during chemotaxis. J. Cell Biol. 169, 321–329.
Peak, M., al-Habori, M., Agius, L., 1992. Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalinization in mediating the effects of insulin. Biochem. J. 282 (Pt 3), 797–805.
Poincloux, R., Lizarraga, F., Chavrier, P., 2009. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. J. Cell Sci. 122, 3015–3024.
Poincloux, R., Vincent, C., Labrousse, A., Castandet, J., Rigo, M., Cougoule, C., Bordier, C., Le Cabec, V., Maridonneau-Parini, I., 2006. Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. Eur. J. Cell Biol. 85, 327–332.
Pope, B.J., Zierler-Gould, K.M., Kuhne, R., Weeds, A.G., 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.
Pouyssegur, J., Dayan, F., Mazure, N.M., 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. Nature 441, 437–443.
Pouyssegur, J., Franchi, A., L'Allemain, G., Paris, S., 1985. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. FEBS Lett. 190, 115–119.
Putney, L.K., Barber, D.L., 2004. Expression profile of genes regulated by activity of the Na–H exchanger NHE1. BMC Genomics 5, 46.
Putney, L.K., Denker, S.P., Barber, D.L., 2002. The changing face of the Na^+/H^+ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42, 527–552.
Ra, H.J., Parks, W.C., 2007. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. Matrix Biol. 26, 587–596.
Reshkin, S.J., Bellizzi, A., Albarani, V., Guerra, L., Tommasino, M., Paradiso, A., Casavola, V., 2000a. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na(+)/H(+) exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. J. Biol. Chem. 275, 5361–5369.
Reshkin, S.J., Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V., Malanchi, I., Poignee, M., Alunni-Fabbroni, M., Casavola, V., Tommasino, M., 2000b. Na^+/H^+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. FASEB J. 14, 2185–2197.
Riihonen, R., Nielsen, S., Vaananen, H.K., Laitala-Leinonen, T., Kwon, T.H., 2010. Degradation of hydroxyapatite in vivo and in vitro requires osteoclastic sodium-bicarbonate co-transporter NBCn1. Matrix Biol. 29, 287–294.
Riihonen, R., Supuran, C.T., Parkkila, S., Pastorekova, S., Vaananen, H.K., Laitala-Leinonen, T., 2007. Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts. Bone 40, 1021–1031.
Robey, I.F., Baggett, B.K., Kirkpatrick, N.D., Roe, D.J., Dosescu, J., Sloane, B.F., Hashim, A.I., Morse, D.L., Raghunand, N., Gatenby, R.A., Gillies, R.J., 2009. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. Cancer Res. 69, 2260–2268.
Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Kindem, K., Galappathi, K., 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. Cancer Res. 66, 6699–6707.
Rossi, F., Siniscalco, D., Luongo, L., De Petrocellis, L., Bellini, G., Petrosino, S., Torella, M., Santoro, C., Nobili, B., Perrotta, S., Di Marzo, V., Maione, S., 2009. The endovanilloid/endocannabinoid system in human osteoclasts: possible involvement in bone formation and resorption. Bone 44, 476–484.
Rousselle, A.V., Heymann, D., 2002. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 30, 533–540.
Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., Sloane, B.F., 1994. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. Cancer Res. 54, 6517–6525.
Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., Chavrier, P., 2008. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. J. Cell Biol. 181, 985–998.
Saltel, F., Daubon, T., Juin, A., Ganuza, I.E., Veillat, V., Genot, E., 2011. Invadosomes: intriguing structures with promise. Eur. J. Cell Biol. 90, 100–107.
Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D., Jurdic, P., 2004. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. Mol. Biol. Cell 15, 5231–5241.
Sapadin, A.N., Fleischmajer, R., 2006. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. J. Am. Acad. Dermatol. 54, 258–265.
Sardet, C., Franchi, A., Pouyssegur, J., 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. Cell 56, 271–280.
Schelling, J.R., Abu Jawdeh, B.G., 2008. Regulation of cell survival by Na^+/H^+ exchanger-1. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 295, F625–F632.
Schlesinger, P.H., Mattsson, J.P., Blair, H.C., 1994. Osteoclastic acid transport: mechanism and implications for physiological and pharmacological regulation. Miner. Electrolyte Metab. 20, 31–39.
Schoumacher, M., Louvard, D., Vignjevic, D., 2011. Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. Eur. J. Cell Biol. 90, 93–99.
Scimeca, J.C., Franchi, A., Trojani, C., Parrinello, H., Grosgeorge, J., Robert, C., Jaillon, O., Poirier, C., Gaudray, P., Carle, G.F., 2000. The gene encoding the mouse homologue of the human osteoclast-specific 116-kDa V-ATPase subunit bears a deletion in osteosclerotic (oc/oc) mutants. Bone 26, 207–213.
Sennoune, S.R., Bakunts, K., Martinez, G.M., Chua-Tuan, J.L., Kebir, Y., Attaya, M.N., Martinez-Zaguilan, R., 2004. Vacuolar H^+-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286, C1443–C1452.
Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 288–300.

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

Spitzer, K.W., Ershler, P.R., Skolnick, R.L., Vaughan-Jones, R.D., 2000. Generation of intracellular pH gradients in single cardiac myocytes with a microperfusion system. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 278, H1371–H1382.
Spitzer, K.W., Skolnick, R.L., Peercy, B.E., Keener, J.P., Vaughan-Jones, R.D., 2002. Facilitation of intracellular H(+) ion mobility by CO(2)/HCO(3)(−) in rabbit ventricular myocytes is regulated by carbonic anhydrase. J. Physiol. 541, 159–167.
Spugnini, E.P., Citro, G., Fais, S., 2010. Proton pump inhibitors as anti vacuolar-ATPases drugs: a novel anticancer strategy. J. Exp. Clin. Cancer Res. 29, 44.
Srivastava, J., Barreiro, G., Groscurth, S., Gingras, A.R., Goult, B.T., Critchley, D.R., Kelly, M.J., Jacobson, M.P., Barber, D.L., 2008. Structural model and functional significance of pH-dependent talin-actin binding for focal adhesion remodeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 14436–14441.
Steffan, J.J., Snider, J.L., Skalli, O., Welbourne, T., Cardelli, J.A., 2009. Na^+/H^+ exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. Traffic 10, 737–753.
Steffan, J.J., Williams, B.C., Welbourne, T., Cardelli, J.A., 2010. HGF-induced invasion by prostate tumor cells requires anterograde lysosome trafficking and activity of Na^+–H^+ exchangers. J. Cell Sci. 123, 1151–1159.
Steffen, A., Le Dez, G., Poincloux, R., Recchi, C., Nassoy, P., Rottner, K., Galli, T., Chavrier, P., 2008. MT1-MMP-dependent invasion is regulated by TI-VAMP/VAMP7. Curr. Biol. 18, 926–931.
Stewart, A.K., Boyd, C.A., Vaughan-Jones, R.D., 1999. A novel role for carbonic anhydrase: cytoplasmic pH gradient dissipation in mouse small intestinal enterocytes. J. Physiol. 516 (Pt 1), 209–217.
Stock, C., Cardone, R.A., Busco, G., Krahling, H., Schwab, A., Reshkin, S.J., 2008. Protons extruded by NHE1: digestive or glue? Eur. J. Cell Biol. 87, 591–599.
Stock, C., Ludwig, F.T., Schwab, A., 2012. Is the multifunctional na(+)/h(+) exchanger isoform 1 a potential therapeutic target in cancer? Curr. Med. Chem. 19, 647–660.
Stock, C., Mueller, M., Kraehling, H., Mally, S., Noel, J., Eder, C., Schwab, A., 2007. pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. Cell. Physiol. Biochem. 20, 679–686.
Stock, C., Schwab, A., 2009. Protons make tumor cells move like clockwork. Pflugers Arch. 458, 981–992.
Stock, C., Schwab, A., 2006. Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration. Acta Physiol. (Oxf.) 187 (1–2), 149–157.
Stuwe, L., Muller, M., Fabian, A., Waning, J., Mally, S., Noel, J., Schwab, A., Stock, C., 2007. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. J. Physiol. 585, 351–360.
Sundquist, K., Lakkakorpi, P., Wallmark, B., Vaananen, K., 1990. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption. Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 309–313.
Supuran, C.T., 2008a. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nat. Rev. Drug Discov. 7, 168–181.
Supuran, C.T., 2008b. Carbonic anhydrases – an overview. Curr. Pharm. Des. 14, 603–614.
Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., Marchisio, P.C., 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. Exp. Cell Res. 159, 141–157.
Tatin, F., Varon, C., Genot, E., Moreau, V., 2006. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. J. Cell Sci. 119, 769–781.
Teti, A., Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., Kahn, A.J., Koziol, C., Konsek, J., Zambonin-Zallone, A., Schlesinger, P.H., 1989a. Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. J. Clin. Invest. 83, 227–233.
Teti, A., Grano, M., Carano, A., Colucci, S., Zambonin Zallone, A., 1989b. Immunolocalization of beta 3 subunit of integrins in osteoclast membrane. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 65, 1031–1037.
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. J. Cell. Physiol. 150, 534–544.
Tominaga, T., Barber, D.L., 1998. Na–H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. Mol. Biol. Cell 9, 2287–2303.
Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Oka, T., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Futai, M., 2003. From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H^+-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. J. Biol. Chem. 278, 22023–22030.
Toyomura, T., Oka, T., Yamaguchi, C., Wada, Y., Futai, M., 2000. Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H(+)-ATPase. Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. J. Biol. Chem. 275, 8760–8765.
Tu, C., Ortega-Cava, C.F., Chen, G., Fernandes, N.D., Cavallo-Medved, D., Sloane, B.F., Band, V., Band, H., 2008. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. Cancer Res. 68, 9147–9156.
Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., Bieth, J.G., 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. Biochemistry 32, 375–380.
Vaananen, H.K., Karhukorpi, E.K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roininen, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J., Lakkakorpi, P., 1990. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. J. Cell Biol. 111, 1305–1311.
Vaananen, H.K., Laitala-Leinonen, T., 2008. Osteoclast lineage and function. Arch. Biochem. Biophys. 473, 132–138.
Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, J.M., 2000. The cell biology of osteoclast function. J. Cell Sci. 113 (Pt 3), 377–381.
Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324, 1029–1033.
Vaughan-Jones, R.D., Peercy, B.E., Keener, J.P., Spitzer, K.W., 2002. Intrinsic H(+) ion mobility in the rabbit ventricular myocyte. J. Physiol. 541, 139–158.
Vexler, Z.S., Symons, M., Barber, D.L., 1996. Activation of Na^+–H^+ exchange is necessary for RhoA-induced stress fiber formation. J. Biol. Chem. 271, 22281–22284.
Wagner, C.A., Finberg, K.E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D., Geibel, J.P., 2004. Renal vacuolar H^+-ATPase. Physiol. Rev. 84, 1263–1314.
Weaver, A.M., 2006. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. Clin. Exp. Metastasis 23, 97–105.
Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., Barber, D.L., 2011. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. Nat. Rev. Cancer 11, 671–677.
Weber, W.A., Ziegler, S.I., Thodtmann, R., Hanauske, A.R., Schwaiger, M., 1999. Reproducibility of metabolic measurements in malignant tumors using FDG PET. J. Nucl. Med. 40, 1771–1777.
Wiesner, C., Faix, J., Himmel, M., Bentzien, F., Linder, S., 2010. KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages. Blood 116, 1559–1569.
Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L.M., von Andrian, U.H., van Rheenen, J., Deryugina, E., Friedl, P., 2009. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 931–941.
Yang, X., Wang, D., Dong, W., Song, Z., Dou, K., 2010. Over-expression of Na^+/H^+ exchanger 1 and its clinicopathologic significance in hepatocellular carcinoma. Med. Oncol. 27, 1109–1113.
Yuan, F.L., Li, X., Lu, W.G., Li, C.W., Li, J.P., Wang, Y., 2010. The vacuolar ATPase in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. Mol. Biol. Rep. 37, 3561–3566.
Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., Marchisio, P.C., 1988. The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. J. Bone Miner. Res. 3, 517–523.
Zhao, H., Ettala, O., Vaananen, H.K., 2002. Intracellular membrane trafficking pathways in bone-resorbing osteoclasts revealed by cloning and subcellular localization studies of small GTP-binding rab proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1060–1065.
Zhao, H., Patrick Ross, F., 2007. Mechanisms of osteoclastic secretion. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1116, 238–244.
Zuo, J., Jiang, J., Chen, S.H., Vergara, S., Gong, Y., Xue, J., Huang, H., Kaku, M., Holliday, L.S., 2006. Actin binding activity of subunit B of vacuolar H^+-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 21, 714–721.

Please cite this article in press as: Brisson, L., et al., pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur. J. Cell Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.04.004

III. Canaux sodiques dépendants du voltage et invasivité des cellules cancéreuses

Depuis la fin des années 1980, le rôle des canaux ioniques dans les cancers a été mis en évidence. L'expression ou le fonctionnement de canaux ioniques est retrouvée altérée dans de nombreux cancers tels que les leucémies, les lymphomes, les gliomes, les neuroblastomes ou encore les cancers du sein, de la prostate, du poumon ou du colon. Leur implication dans les propriétés des cellules cancéreuses est très variée allant d'un rôle dans la prolifération, l'apoptose, le contrôle du volume cellulaire à une augmentation des propriétés de migration et d'invasivité des cellules cancéreuses (Arcangeli *et al.*, 2009; Arcangeli and Yuan, 2011; Becchetti, 2011; Conti, 2007; Cuddapah and Sontheimer, 2011; Fiske *et al.*, 2006; Fraser and Pardo, 2008; Kunzelmann, 2005; Le Guennec *et al.*, 2007; Lehen'kyi *et al.*, 2011; Schonherr, 2005). Une revue récente met en perspective le rôle des canaux ioniques avec les propriétés des cellules cancéreuses décrites par Hanahan and Weinberg permettant ainsi de souligner l'implication de canaux ioniques dans toutes les grandes propriétés des cellules cancéreuses (Prevarskaya *et al.*, 2010). De par leur implication croissante dans la formation et le développement des cancers mais aussi leur accessibilité due à leur présence au niveau de la membrane plasmique, l'étude du rôle des canaux ioniques est devenu un champ prometteur dans le domaine du cancer. Une meilleure compréhension de leur rôle permettrait le développement de nouveaux outils diagnostiques ou thérapeutiques dans la prise en charge du cancer.

A. Canaux sodiques dépendants du voltage

Les canaux sodiques dépendants du voltage Na_V catalysent le transport de sodium vers le milieu intracellulaire selon son gradient de concentration suite à une dépolarisation membranaire. Ils sont exprimés dans des cellules excitables où ils participent à la formation et à la propagation du potentiel d'action mais aussi dans des cellules dites non-excitables où ils régulent de multiples fonctions cellulaires. Leur activité est dépendante du voltage membranaire et peut être régulée par de nombreux signaux intracellulaires. L'expression de canaux sodiques dépendants du voltage a récemment été retrouvée dans des cellules

cancéreuses épithéliales et une participation au phénomène d'invasivité cellulaire leur a été attribuée.

1. Structure et fonctionnement

Depuis les travaux de Hodgkin et Huxley (Hodgkin and Huxley, 1952), les canaux sodiques dépendants du voltage sont caractérisés par leur sélectivité pour les ions sodium, une activation dépendante du voltage et des cinétiques rapides d'activation et d'inactivation. Ces canaux sont composés d'une sous-unité principale α associée à une ou plusieurs sous-unités β dites auxiliaires ou régulatrices (Beneski and Catterall, 1980).

a) Sous-unité principale α

Les canaux Na_V ont été les premiers membres de la famille des canaux ioniques découverts alors que la mise en évidence de la structure tridimensionnelle de la sous-unité principale par cristallographie n'est que très récente et seulement obtenue pour un canal bactérien (Payandeh *et al.*, 2011). La sous-unité α, constituée d'environ 2000 acides aminés, contient tous les éléments nécessaires au fonctionnement du canal sodique dépendant du voltage : le pore, le filtre de sélectivité, le senseur de voltage, la boucle d'inactivation ainsi que les sites impliqués dans la régulation pharmacologique de l'activité du canal. Le clonage et le séquençage de la sous-unité α ont permis de démontrer que son expression seule permet d'avoir un canal fonctionnel bien qu'elle soit en condition native associée aux sous-unités β (Goldin *et al.*, 1986; Noda *et al.*, 1986).

Chez les mammifères, il existe 10 gènes codants pour 9 isoformes de canaux sodiques dépendants du voltage fonctionnellement caractérisées et une dixième isoforme particulière dont le rôle n'est pas encore totalement élucidé. Une nomenclature a été définie afin de clarifier les différentes dénominations données aux canaux sodiques dépendants du voltage. Cette nomenclature attribue aux différentes isoformes les noms de $Na_V1.1$ à 1.9 et Na_X pour l'isoforme particulière : Na pour l'ion perméant, V pour la sensibilité au voltage suivie de la famille et du membre de la famille allant de 1.1 à 1.9 puisqu'il n'existe actuellement qu'une seule famille décrite comprenant 9 isoformes (Goldin *et al.*, 2000).

Des études phylogénétiques ont permis de mieux comprendre les différences pouvant exister entre ces différentes isoformes (Goldin *et al.*, 2000). Il s'agit des canaux ioniques provenant d'un stade d'évolution récent comparé aux autres canaux ioniques tout comme les canaux calciques dépendants du voltage qui possèdent une structure similaire. Les canaux Na_V sont très conservés entre invertébrés et vertébrés indiquant que l'établissement de leur structure a eu lieu avant la séparation de ces deux embranchements (Plummer and Meisler, 1999). Au contraire des canaux potassiques dépendants du voltage qui s'assemblent en 4 sous-unités pour former un canal fonctionnel, les canaux Na_V et Ca_V ont une structure en une seule sous-unité formée de 4 domaines identiques aux sous-unités des canaux potassiques. Cette 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. Ces différentes analyses ont permis de séparer les isoformes de Na_V en 4 groupes. Le premier groupe contient les gènes codant pour les canaux sodiques neuronaux $Na_V1.1$, $Na_V1.2$, $Na_V1.3$ et $Na_V1.7$ situés sur le chromosome 2 et possédant des caractéristiques similaires en termes de séquence, de cinétiques, de sensibilité à un inhibiteur pharmacologique, la tétrodotoxine (TTX), qui est de l'ordre du nanomolaire et de distribution puisqu'ils sont tous exprimés au niveau du système nerveux central. Le deuxième groupe contient les gènes codants pour les isoformes $Na_V1.5$, $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$ situés sur le chromosome 3. Bien qu'ils partagent 75 % de leur séquence avec les isoformes précédentes, des modifications de certains acides aminés leur confèrent différentes sensibilités à la TTX. Il a été montré que dans l'isoforme cardiaque $Na_V1.5$, le changement d'un seul acide aminé phénylalanine en une cystéine sur la région du pore du domaine I est responsable d'une diminution de 200 fois de la sensibilité à la TTX par rapport aux canaux sodiques présents sur le chromosome 2 (Satin *et al.*, 1992). Pour les isoformes $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$ exprimées au niveau du système nerveux périphérique, une modification de la même phénylalanine en une sérine au lieu de la cystéine présente dans l'isoforme $Na_V1.5$ induit une résistance à la TTX encore plus importante (Sivilotti *et al.*, 1997). Les isoformes $Na_V1.4$ (muscle squelettique) et $Na_V1.6$ (système nerveux central) constituent à eux seuls les $3^{èmes}$ et $4^{èmes}$ groupes. Leur structure est relativement proche de celle des isoformes du premier groupe présentant 84 % d'homologie de séquence et une sensibilité à la TTX de l'ordre du nanomolaire mais ont une distance phylogénétique plus grande ce qui coïncide avec leur localisation distante : $Na_V1.4$ sur le chromosome 11 et $Na_V1.6$ sur le chromosome 15. La $10^{ème}$ isoforme Na_X située sur le chromosome 2 est plus éloignée en séquence et plus loin d'un point de vue de l'évolution. Il est suggéré qu'elle ne

fonctionne pas comme un canal dépendant du voltage mais plutôt comme un détecteur de sel (Hiyama *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2000).

Les 10 isoformes de sous-unités α présentent toutes une structure en 4 domaines répétés (I-IV) contenant chacun 6 segments transmembranaires (S1-S6) et sont d'une taille d'environ 260 kDa (Figure 12). Au sein de ces domaines, les segments S1 à S4 sont responsables de la sensibilité au voltage, les segments S5, S6 ainsi que la boucle les reliant constituent le pore du canal et son filtre de sélectivité. Des boucles courtes intracellulaires ou extracellulaires relient les segments transmembranaires entre eux, celle située entre les segments S5 et S6 étant la plus longue et entrant dans le pore du coté extracellulaire. Les domaines sont également reliés entre eux par des boucles plus longues que celles localisées entre les segments et sont le site de régulations intracellulaires. Les domaines N- et C-terminaux sont situés dans la partie intracellulaire et sont également impliqués dans la régulation de l'activité du canal par des signaux intracellulaires.

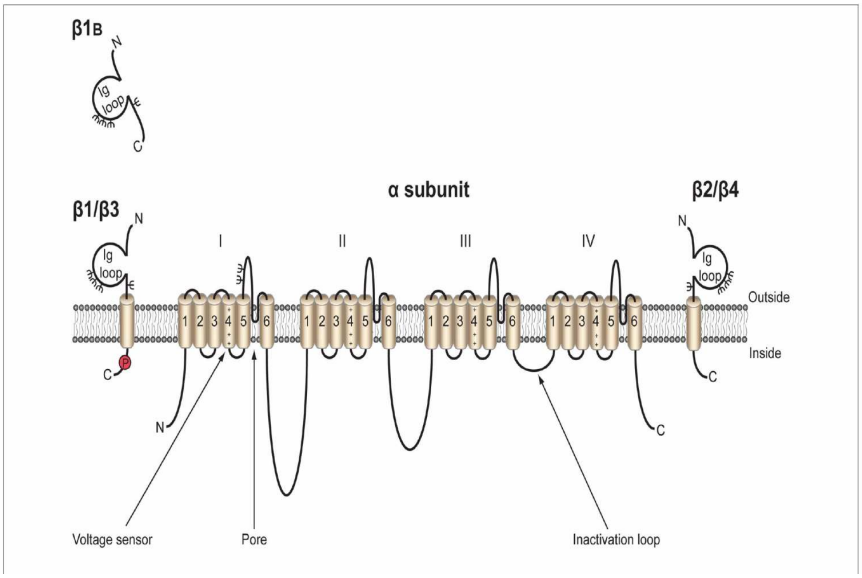


Figure 12 : Structure des canaux sodiques dépendants du voltage.
d'après Brackenbury and Isom, 2011.

Bien que le canal sodique dépendant du voltage soit le premier canal découvert, la résolution de sa structure par cristallographie n'est que récente et arrive plus de 10 ans après celle d'un canal potassique procaryote par l'équipe de MacKinnon qui lui a valu un prix Nobel de chimie en 2003 (Doyle *et al.*, 1998). La récente cristallisation du canal sodique bactérien Na_VAb à une résolution de 2,7 Å a permis d'apporter de nouveaux éléments concernant le fonctionnement des canaux sodiques dépendants du voltage (Payandeh *et al.*, 2011). En

revanche, ce canal bactérien n'est pas arrangé en un seul domaine mais en un homotétramère, faisant de ce canal un modèle proche des canaux Na_V mais possédant certaines différences notamment concernant l'inactivation. Vu du dessus, le canal Na_VAb est formé d'un pore central entouré de 4 modules permettant la formation du pore composés des segments S5 S6 et de la boucle les reliant. Chaque module permettant la formation du pore est associé à un module permettant la détection du voltage (Figure 13).

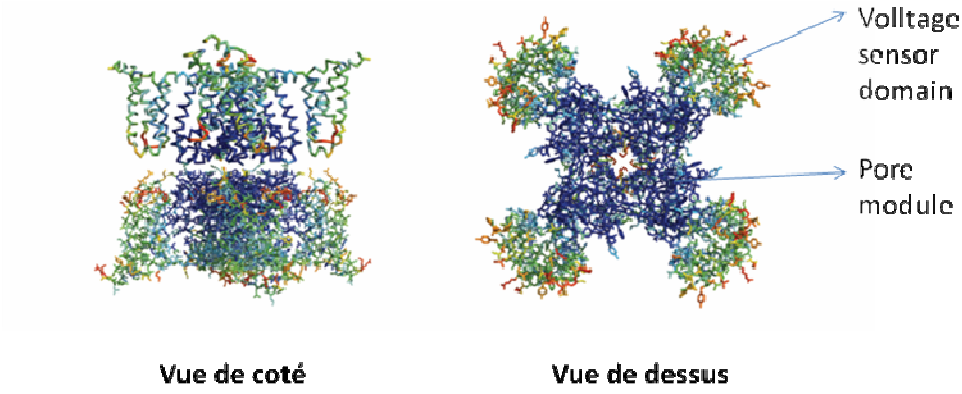


Figure 13 : Structure tridimensionnelle du canal sodique dépendant du voltage Na_VAb.
d'après Payandeh *et al.*, 2011.

La découverte des sites de fixation de la tétrodotoxine, toxine bloquant le pore du canal, sur la boucle entre les segments S5 et S6 a permis de déterminer que ces segments ainsi que la boucle située entre eux étaient responsables de la formation du pore (Noda *et al.*, 1989; Terlau *et al.*, 1991). Des mutations sur ces mêmes acides aminés responsables de la fixation de la TTX sont capables de modifier la sélectivité du canal et de le rendre perméable au calcium (Heinemann *et al.*, 1992). Le pore est donc formé des segments S5 et S6 ainsi que de la boucle qui rentre dans la partie transmembranaire du canal et constitue le filtre de sélectivité. Le pore se compose d'un grand entonnoir à l'extérieur, d'un filtre de sélectivité, d'une grande cavité centrale entourée par le segment S6 et remplie de molécules d'eau et d'une porte d'activation intracellulaire à l'extrémité du segment S6 (Figure 14) (Payandeh *et al.*, 2011). 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 entre l'ion potassium et les acides aminés du filtre de sélectivité (Zhou *et al.*, 2001), le transport de sodium par le canal Na_VAb semble s'effectuer sous forme hydraté. Le filtre de sélectivité est formé d'un premier site de 4 glutamines (site HFS) qui déshydrate partiellement l'ion perméant qui est ensuite réhydraté lors de son passage sur les deux sites suivants (site CEN et IN). Le sodium hydraté

peut alors atteindre la cavité centrale et passer dans le compartiment intracellulaire lorsque la porte d'activation est ouverte (Figure 14) (Payandeh *et al.*, 2011).

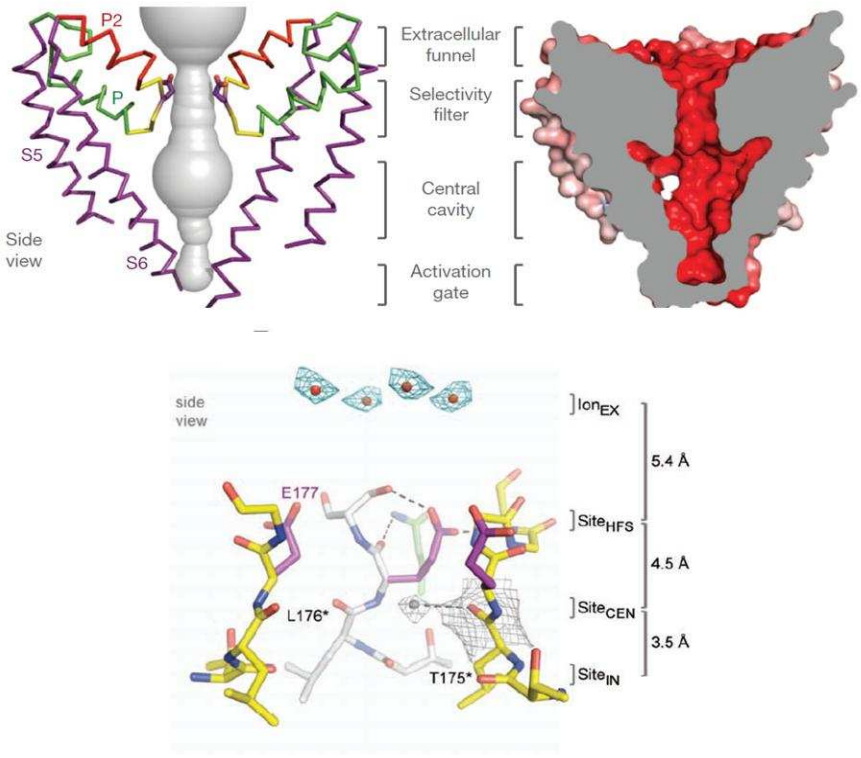


Figure 14 : Structure du pore et du filtre de sélectivité du canal sodique dépendant du voltage bactérien Na_VAb.

d'après Payandeh *et al.*, 2011.

Le mécanisme par lequel les canaux dépendants du voltage sont capables de détecter un changement de potentiel lors de l'activation est encore sujet à controverse. Depuis les premiers travaux de Hodgkin et Huxley (Hodgkin and Huxley, 1952), il est prédit que l'activation des canaux par le potentiel implique des mouvements de charges qui après leur mesure ont été estimés à un mouvement de 12 à 16 charges positives vers l'extérieur lors de l'activation des canaux potassiques et sodiques (Bezanilla, 2000). Le segment S4 est composé d'un motif hautement conservé formé de 4 résidus d'acides aminés chargés positivement (souvent arginine) espacés de 2 résidus d'acides aminés hydrophobes. Il existe deux modèles principaux pour expliquer le mouvement de ces charges au cours d'une dépolarisation (Figure 15) (Elinder *et al.*, 2007). Dans le modèle « sliding helix » le segment S4 est en position transmembranaire à l'état fermé et effectue lors de l'activation par une dépolarisation un

mouvement hélicoïdal à l'aide de charges négatives situées sur les segments S2 et S3 adjacents (Catterall, 1986; Guy and Seetharamulu, 1986). La cristallisation du canal K_VAP a remis en question le précédant modèle à cause d'une localisation surprenante du segment S4 ce qui a conduit à proposer le modèle « paddle » (Jiang *et al.*, 2003). Dans ce modèle, le segment S4 est situé près de la surface intracellulaire à l'état fermé et se déplace telle une pagaie à travers la bicouche lipidique lors de l'activation. Ces deux modèles possèdent comme différence majeure les interactions qui ont lieu durant l'activation : des interactions protéiques dans le modèle « sliding helix » ou des interactions lipidiques dans le modèle « paddle ».

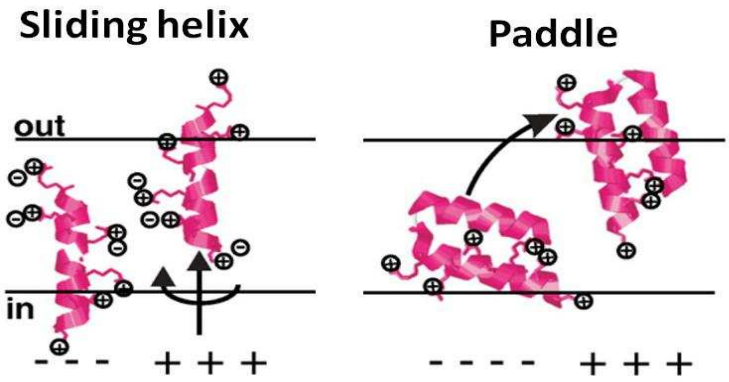


Figure 15 : Modèles du mécanisme du mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation.
d'après Elinder *et al.*, 2007.

Depuis l'établissement de ces deux modèles, de nombreux arguments en faveur du modèle « sliding helix » ont émergé (Catterall, 2010b). Dans ce modèle, le segment S4 doit être en position transmembranaire à l'état fermé et à l'état activé. Cette position transmembranaire du segment S4 des canaux Na_V a été confirmée par des études de fixation de toxines de scorpion qui se fixent sur la boucle S3-S4 à la fois à l'état fermé mais aussi à l'état activé (Cestele *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). La stabilisation des charges positives dans une configuration transmembranaire est effectuée par des liaisons ioniques avec des résidus chargés négativement sur les segments S1, S2 ou S3 de leur environnement. Des mutations sur des arginines du segment S4 de canaux sodiques réduit l'activation dépendante du voltage confirmant l'implication de ces charges dans le mécanisme d'activation par le voltage (Kontis *et al.*, 1997; Stuhmer *et al.*, 1989). Le mouvement des charges vers l'extérieur est catalysé par

l'échange de ces liaisons ioniques. Il a été montré par différents types d'études que le segment S4 des canaux Na_V se déplaçait vers l'extérieur dans un mouvement de rotation lors d'une dépolarisation membranaire (Yang and Horn, 1995; Yang *et al.*, 1996). La démonstration de la formation de liaisons ioniques et de leur échange lors de l'activation a également été faite sur un canal sodique bactérien (DeCaen *et al.*, 2008; DeCaen *et al.*, 2009; DeCaen *et al.*, 2011). Le mécanisme permettant l'ouverture du pore à partir du mouvement du système de détection du voltage est encore peu connu. Le lien le plus simple entre le système de senseur et le pore est la boucle reliant les segments S4 et S5 qui permettrait de communiquer l'activation par le voltage au pore pour permettre son ouverture par une force sur le segment S5. Un seul point de contact n'est pas suffisant à l'établissement d'une force nécessaire pour ouvrir le pore. D'autres points de contact ont été mis en évidence et pourraient servir à l'ouverture du pore (Broomand *et al.*, 2003; Gandhi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). L'ouverture du pore du canal pourrait être effectuée par un fléchissement au niveau d'une région du segment S6 composée d'un résidu glycine (Zhao *et al.*, 2004).

Les canaux Na_V sont caractérisés par une inactivation rapide qui apparaît après l'activation du canal et dont la cinétique dépend de l'isoforme du canal. Les premières indications sur le mécanisme de l'inactivation rapide des canaux sodiques dépendants du voltage ont été faites par la découverte de l'implication d'un composant de la protéine situé sur la face intracellulaire du canal (Armstrong *et al.*, 1973). Il a ensuite été précisé que le domaine responsable de l'inactivation rapide était situé sur la boucle reliant les domaines III et IV et que cette porte d'inactivation pouvait se replier et bloquer le pore durant l'inactivation (Vassilev *et al.*, 1988). Cette boucle intracellulaire d'inactivation est composée d'un motif hydrophobe isoleucine phénylalanine méthionine (IFM) nécessaire pour maintenir l'état fermé de la porte d'inactivation (Figure 16) (West *et al.*, 1992). Un peptide contenant ce motif est capable de restaurer l'inactivation de canaux mutants (Eaholtz *et al.*, 1994). Quelques millisecondes après l'activation, la boucle se replie au niveau de résidus glycine et proline pour interagir avec le pore et bloquer la conductance (Kellenberger *et al.*, 1997). L'analyse de cette porte d'inactivation par RMN a permis de montrer qu'elle contenait une structure de type hélice α précédée par deux boucles qui déploient le motif IFM hautement conservé dans les 10 isoformes de Na_V pour bloquer l'ouverture du pore (Rohl *et al.*, 1999; West *et al.*, 1992). La porte d'inactivation rapide n'est pas présente dans le canal Na_VAb du fait de sa structure en homo-tétramère, des études structurales sur des canaux de mammifères sont nécessaires afin de mieux connaître sa structure tridimensionnelle.

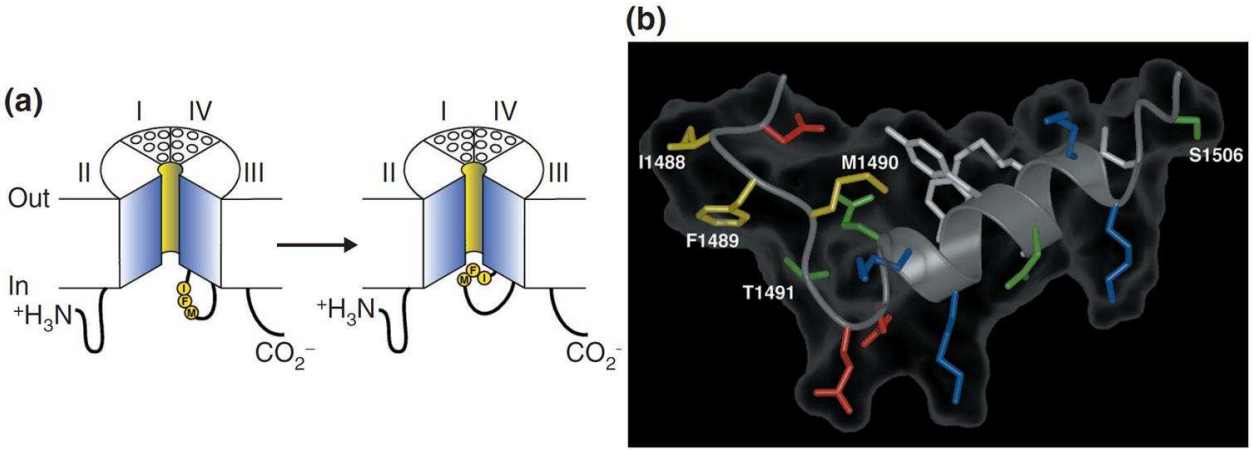


Figure 16 : Modèle du mécanisme d'inactivation rapide des canaux sodiques dépendants du voltage.

d'après Yu and Catterall, 2003.

Les canaux sodiques dépendants du voltage possèdent en plus de la composante rapide de l'inactivation, une inactivation plus lente dont le mécanisme n'est pas clairement établi (Vilin and Ruben, 2001). Le canal sodique bactérien Na_VAb bien que ne possédant pas d'inactivation rapide, possède une inactivation similaire à l'inactivation lente des canaux exprimés chez les mammifères. La très récente cristallisation du canal sodique bactérien Na_VAb dans un état inactivé a permis d'identifier des changements structuraux au niveau du pore et du filtre de sélectivité qui pourraient être impliqués dans l'inactivation lente des canaux sodiques dépendants du voltage (Payandeh *et al.*, 2012).

b) Sous-unités β

La purification et la caractérisation des canaux sodiques dépendants du voltage a permis de mettre en évidence la présence d'une sous-unité α associée à une ou plusieurs sous-unités β auxiliaires (Beneski and Catterall, 1980). La famille des sous-unités auxiliaires des canaux Na_V comprend 4 membres β1, β2, β3, et β4. Obtenues par purification chez le rat, les deux premières isoformes identifiées ont été β1 et β2 d'une masse moléculaire de 39 et 37 kDa respectivement (Hartshorne and Catterall, 1984). Deux nouvelles isoformes ont été identifiées plus récemment par des analyses génomiques β3 (Morgan *et al.*, 2000) et β4 (Yu *et al.*, 2003). Ces protéines sont formées d'un segment transmembranaire, d'un court domaine C-terminal intracellulaire et d'un grand domaine N-terminal extracellulaire de structure similaire à la

chaîne variable des immunoglobulines (Figure 12) (Isom *et al.*, 1992; Isom *et al.*, 1995a; Morgan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). Les sous-unités β interagissent avec la sous-unité α à travers leur domaine similaire aux immunoglobulines. Les sous-unités β1 et β3 qui sont les plus proches en séquence d'acides aminés interagissent avec la sous-unité α de manière non covalente alors que les sous-unités β2 et β4 également proches en séquence entre elles interagissent avec la sous-unité α par des ponts disulfures. Il existe une nouvelle isoforme β1B variant d'épissage de β1 différente des autres sous-unités (Qin *et al.*, 2003). Cette isoforme possède le même domaine immunoglobuline mais elle n'a pas de segment transmembranaire et serait une sous-unité soluble (Patino *et al.*, 2011).

Les sous-unités β sont capables de moduler l'adressage des canaux sodiques Na_V ainsi que leurs cinétiques d'activation et d'inactivation et sont impliquées en cas de mutations dans des pathologies telles que l'épilepsie ou des arythmies cardiaques (Abriel, 2010; Brackenbury and Isom, 2011; Chen *et al.*, 2002; Isom *et al.*, 1995b). De la même manière que les autres protéines possédant un domaine semblable aux immunoglobulines, les sous-unités β ont un rôle de molécules d'adhésion. Elles sont capables d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire ou des protéines d'adhésion cellulaire (McEwen *et al.*, 2009; Ratcliffe *et al.*, 2001; Srinivasan *et al.*, 1998). Les différents rôles des sous-unités β sont variés et dépendent de l'isoforme de sous-unité α, β et du type cellulaire. Les sous-unités β sont fortement exprimées dans les cellules excitables mais sont également retrouvées dans des cellules non excitables et des lignées de cellules cancéreuses mammaires ou prostatiques où il est proposé qu'elles participent à l'adhésion et à la migration des cellules mais aussi à l'expression de la sous-unité α (Chioni *et al.*, 2009; Diss *et al.*, 2008).

2. Pharmacologie

L'étude des canaux sodiques dépendants du voltage a été facilitée par la découverte d'agents pharmacologiques bloquant ou modulant l'activité de ces canaux. L'étude des sites de fixation de toxines sur la sous-unité α ont permis de grandes avancées concernant l'identification de la structure du canal permettant son fonctionnement. Les canaux sodiques dépendants du voltage possèdent sur leur sous-unité α neuf sites de fixation pour des toxines ou des molécules pharmacologiques qui peuvent être classés en trois groupes selon leur mode d'action (Anger *et al.*, 2001; Cestele and Catterall, 2000). Ces toxines peuvent réduire le courant par blocage

du pore ou modifier les propriétés de dépendance au voltage du canal en se fixant sur des domaines intramembranaires ou extracellulaires. Les toxines se fixant sur le site n°1 ont une action de réduction du courant par blocage du pore. Ce site situé sur la boucle entre les segments S5 et S6 formant le pore est occupé par la fixation de tétrodotoxine, de saxitoxine et de μ-conotoxine qui agissent sur la face extracellulaire du pore. Les anesthésiques locaux et anti-convulsivants se fixent dans la partie intracellulaire du pore et bloquent le transport de sodium directement. Les toxines (hydrophobes) modifiant la dépendance du canal au voltage en se fixant sur des domaines transmembranaires, se fixent sur les sites 2 et 5. Le site n°2 est occupé par des toxines telles que la grayanotoxine, la batrachotoxine ou encore la vératridine qui se fixent sur le canal dans un état activé et induisent un blocage de l'inactivation du canal conduisant à l'activation d'un courant persistant. Les segments S6 des domaines I et IV sont impliqués dans l'effet de la batrachotoxine (Linford *et al.*, 1998; Trainer *et al.*, 1996). Les toxines du site n°5 induisent un courant persistant de la même manière que celles du site n°2. Les segments S6 du domaine I et S5 du domaine IV sont impliqués dans la fixation de la brevetoxine (Trainer *et al.*, 1991). Les sites 3, 4 et 6 sont situés sur des boucles extracellulaires et diminuent ou bloquent l'inactivation. Les toxines se fixant sur les sites 7 et 8 inhibent l'activation du courant.

La toxine la plus utilisée pour bloquer le fonctionnement des canaux sodiques dépendants du voltage est la tétrodotoxine (TTX). Cette toxine initialement extraite des poissons de la famille des Tetraodontidae, concentrée dans les ovaires et le foie, est également retrouvée dans d'autres espèces animales (Noguchi and Arakawa, 2008). Elle n'est pas produite par ces espèces mais par des bactéries symbiotiques des espèces pseudomonas et vibrio. La TTX est une toxine se fixant spécifiquement sur les canaux Na_V bloquant physiquement le passage des ions à travers le pore (Lee and Ruben, 2008). Cette toxine a permis la classification des canaux Na_V en fonction de leur sensibilité : les isoformes $Na_V1.1$, $Na_V1.2$, $Na_V1.3$, $Na_V1.4$, $Na_V1.6$ et $Na_V1.7$ sont sensibles à des concentrations de TTX de l'ordre du nanomolaire et sont dites TTX sensibles (TTX-S), alors que les isoformes $Na_V1.5$, $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$ sont inhibées par de plus fortes concentrations de TTX de l'ordre du micromolaire et sont dites TTX résistantes (TTX-R). Des mutations sur le site n°1 de fixation des neurotoxines sont responsables de ces différentes sensibilités à la TTX (Satin *et al.*, 1992; Sivilotti *et al.*, 1997).

3. Régulation des canaux sodiques dépendants du voltage et implication physio-pathologique

L'expression fonctionnelle des protéines membranaires peut être régulée à de nombreuses étapes allant de la transcription, la traduction, l'adressage membranaire, au contrôle du recyclage ou de la dégradation. L'expression des dix isoformes de sous-unité α est finement régulée pour permettre leurs localisations spécifiques. Ces isoformes présentent également certaines différences dans leurs propriétés électrophysiologiques (Goldin, 2001). Les différentes régulations des canaux sodiques dépendants du voltage apparaissent dans la Figure 17. L'exemple sera pris de l'isoforme cardiaque $Na_V1.5$ de la sous-unité α des canaux sodiques dépendants du voltage. Le fonctionnement de cette protéine de par son rôle dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action cardiaque est impliqué dans des arythmies cardiaques telles que le syndrome de Brugada, la mort subite du nourrisson ou les syndromes de QT longs (LQTS) en cas de mutations responsables d'altérations du courant sodique ou de sa régulation (Abriel, 2010).

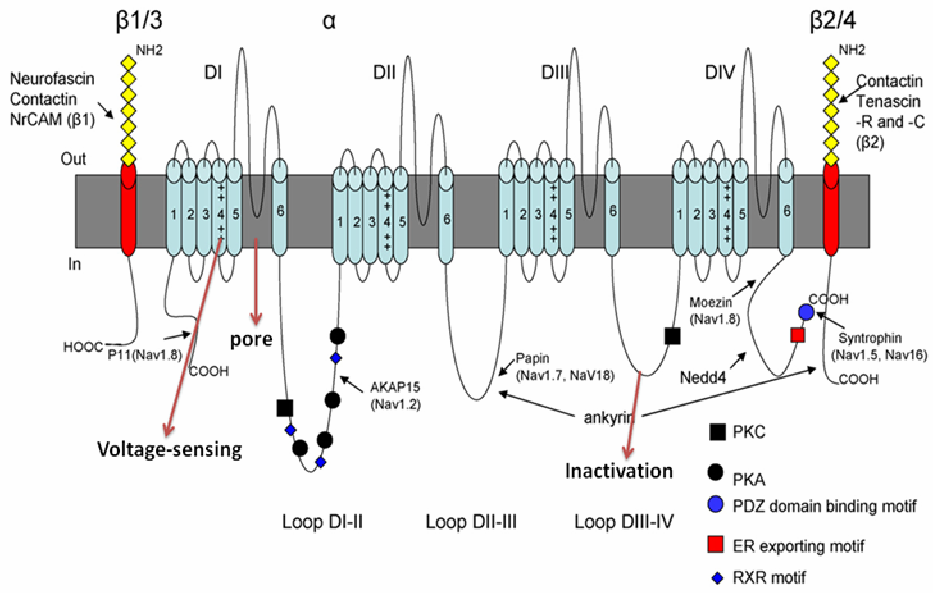


Figure 17 : Régulation des canaux sodiques dépendants du voltage.

D'après Shao *et al.*, 2009.

a) Régulation transcriptionnelle

Peu de choses sont connues concernant la régulation transcriptionnelle des gènes *SCN1A* à *SCN10A* codants pour les 10 isoformes de Na_V. La première démonstration d'un effet

transcriptionnel sur la sous-unité α du canal $Na_V1.5$ a été faite par l'étude d'une molécule utilisée comme anti-arythmique de classe IB, la mexiletine. L'utilisation chronique de cette molécule, qui bloque le canal sodique dépendant du voltage cardiaque $Na_V1.5$, induit le développement de résistances dues à l'augmentation de la quantité d'ARNm de $Na_V1.5$ et du nombre de canaux membranaires (Duff *et al.*, 1992; Ruan *et al.*, 2010; Taouis *et al.*, 1991). Ces données indiquent une régulation de la transcription ou de la stabilité des ARNm de $Na_V1.5$ en réponse à l'inhibition de l'activité de la protéine ainsi qu'une régulation de la localisation de la protéine. Des études précisent que la concentration en calcium intracellulaire est impliquée dans cette augmentation d'expression des ARNm de $Na_V1.5$ (Chiamvimonvat *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1992). Des modifications de concentration calcique peuvent être retrouvées dans certaines pathologies notamment dans l'infarctus du myocarde où une diminution de l'expression des ARNm de $Na_V1.5$ a été observée (Huang *et al.*, 2001).

Des études menées sur les promoteurs des gènes codants pour les différentes isoformes de canaux sodiques dépendants du voltage et notamment $Na_V1.5$ ont permis de mieux caractériser leur promoteur et d'identifier des séquences régulatrices (Shang and Dudley, 2005; Yang *et al.*, 2004). Il a été montré qu'un facteur de transcription REST (RE-l-silencing transcription factor) exprimé dans les tissus non-neuronaux réprime l'expression de nombreux gènes spécifiques des neurones dont l'isoforme de canal sodique $Na_V1.2$ (Chong *et al.*, 1995).

b) Adressage à la membrane et recyclage

L'expression des canaux sodiques Na_V peut également être régulée lors de son adressage à la membrane ou de son recyclage. La protéine $Na_V1.5$ possède des sites RXR, connus pour être des signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique, situés sur la boucle entre les domaines I et II. La phosphorylation du canal $Na_V1.5$ par la Protéine Kinase A (PKA) induit une augmentation du courant sodique Na_V par une induction de l'adressage du canal à la membrane plasmique et la mutation des sites RXR inhibe cet effet (Hallaq *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2002). La protéine P11 (annexin II light chain) faisant partie de la famille des protéines fixant le calcium est capable d'interagir spécifiquement avec le canal $Na_V1.8$ sur sa boucle N-terminale et d'induire sa localisation au niveau de la membrane plasmique (Okuse *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2004).

Les ankyrines, famille de protéines adaptatrices composée de 3 isoformes reliant les protéines membranaires au cytosquelette, sont également impliquées dans la régulation de la localisation membranaire des canaux Na_V. L'ankyrine G interagit avec le canal $Na_V1.5$ et son expression est nécessaire à une localisation correcte des protéines $Na_V1.5$. Un motif de 9 acides aminés permettant l'interaction avec l'ankyrine G a été identifié sur la boucle entre les domaines II et III et est retrouvé conservé dans toutes les isoformes de canaux Na_V (Lemaillet *et al.*, 2003). Une mutation dans ce motif est associée au syndrome Brugada, maladie génétique rare due à une altération du fonctionnement du $Na_V1.5$ et causant des arythmies cardiaques graves. Cette mutation empêche l'interaction entre ankyrine G et $Na_V1.5$ et la bonne localisation du canal sodique au niveau des disques intercalaires des myocytes (Mohler *et al.*, 2004). L'ankyrine B semble également impliquée dans la localisation des canaux Na_V. Des souris knockout pour l'ankyrine B ont une densité de courants sodiques dépendants du voltage plus faible comparée aux contrôles et ces courants présentent des propriétés électrophysiologiques différentes avec une activation et une inactivation à des potentiels plus hyperpolarisés (Chauhan *et al.*, 2000). L'hypothèse d'un arrangement du cytosquelette anormal qui modifierait les cinétiques du canal a été proposée. Des mutations de type perte de fonction sur le gène codant pour l'ankyrine B sont associées à un syndrome d'arythmies cardiaques LQT4 (long QT 4) (Mohler *et al.*, 2003). Le rôle du cytosquelette dans le fonctionnement des canaux sodiques a également été mis en évidence à l'aide de cytochalasine D qui interfère avec la polymérisation de l'actine. Le traitement de myocytes cardiaques par de la cytochalasine D réduit le courant sodique dépendant du voltage et diminue la cinétique d'inactivation (Undrovinas *et al.*, 1995).

La régulation de la localisation des canaux sodiques $Na_V1.5$ peut également faire intervenir des protéines présentes dans le complexe protéique associé à la dystrophine (dystrophin associated protein complex DAPC). Ce complexe protéique est un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Il participe à la structure de la membrane plasmique, à l'homéostasie ionique et à la signalisation transmembranaire. Le canal sodique $Na_V1.5$ via son domaine PDZ interagit avec le complexe syntrophine-dystrophine (Gavillet *et al.*, 2006). Des souris déficientes pour la syntrophine ont une quantité de protéines $Na_V1.5$ et un courant sodique dépendant du voltage diminués alors que la quantité d'ARNm n'est pas modifiée. Dans les cardiomyocytes, les interactions sont différentes en fonction de la localisation du canal $Na_V1.5$: les canaux localisés au niveau des membranes latérales sont co-localisés avec le complexe syntrophine-dystrophine alors que les canaux présents dans les

disques intercalaires sont associés à une protéine de la famille MAGUK (membrane associated guanylate kinase) (Petitprez *et al.*, 2011). Des mutations sur le gène de la syntrophine ont été retrouvées chez des patients présentant des syndromes de LQT (Ueda *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008a).

Le cytosquelette et son interaction avec les canaux sodiques dépendants du voltage apparaît donc comme essentiel pour le fonctionnement des canaux Na_V. Un défaut de localisation des canaux $Na_V1.5$ semble impliqué dans plusieurs pathologies cardiaques. En revanche, l'influence des courants sodiques sur la polymérisation de l'actine n'a pas été démontrée mais sera discutée dans la suite de cette thèse.

Le nombre de canaux présents au niveau de la membrane cellulaire peut également être régulé par leur recyclage ou leur dégradation. Les ubiquitine ligases de la famille Nedd4 possèdent des motifs WW capables de reconnaître les protéines contenant des domaines PY pour leur ajouter une ubiquitine. Les protéines polyubiquitinylées sont dégradées par le protéasome. Parmi les 10 isoformes des sous-unités α des canaux sodiques dépendants du voltage, seules $Na_V1.4$ et $Na_V1.9$ ne possèdent pas de motif PY sur leur boucle C-terminale. Ces motifs peuvent interagir avec Nedd4 et Nedd4-2 (Fotia *et al.*, 2004). En présence de la protéine Nedd4-2 le courant $Na_V1.5$ ainsi que sa distribution à la membrane sont diminués sans modifier ses propriétés électrophysiologiques (Rougier *et al.*, 2005; van Bemmelen *et al.*, 2004). Ces résultats sont corroborés par l'observation d'une augmentation de l'expression protéique du canal $Na_V1.5$ et de son courant lors d'une inhibition du protéasome (Kang *et al.*, 2009).

c) Régulation de l'activité des canaux sodiques dépendants du voltage par des interactions protéiques et des phosphorylations

Les canaux sodiques dépendants du voltage possèdent de multiples sites d'interactions protéiques et de phosphorylations responsables de leur régulation (Figure 17). La sous-unité α des canaux Na_V est le site de phosphorylations par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC), et ces phosphorylations sont impliquées dans la régulation de l'activité du canal (Scheuer, 2011). Plusieurs sites de phosphorylation par la PKA sont situés sur la boucle entre les domaines I et II (Smith and Goldin, 1996) et induisent des effets variés en fonction de la sous-unité impliquée. Une AKAP (A-kinase anchor protein) permet le ciblage de la PKA

sur la sous-unité du canal (Few *et al.*, 2007; Tibbs *et al.*, 1998). Trois sites de phosphorylation par la PKA sont situés sur la sous-unité α $Na_V1.5$ au niveau de la boucle entre les domaines I et II. La phosphorylation de la PKA augmente le courant sodique (Lu *et al.*, 1999) et induit un décalage des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Ono *et al.*, 1993). Les sites de phosphorylation par la PKA sont situés à proximité du motif RXR responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Il est proposé que la phosphorylation du canal par la PKA masque le signal de rétention dans le réticulum endoplasmique et permet une augmentation de l'expression du canal au niveau de la membrane plasmique et donc l'augmentation de courant observée (Zhou *et al.*, 2000). Des sites de phosphorylation par la PKC sont situés sur la boucle entre les domaines III et IV, responsable de l'inactivation du canal (West *et al.*, 1991). Le courant $Na_V1.5$ est réduit par une phosphorylation par la PKC (Qu *et al.*, 1996). Il peut de plus exister des relations entre phosphorylation par la PKA et celle par la PKC (Cantrell *et al.*, 1999). Une mutation sur le gène codant pour la GPDL1 (glycerol 3 phosphate dehydrogenase like protein), connue pour interagir avec le canal $Na_V1.5$ est associée au syndrome de Brugada et à la mort subite du nourrisson (London *et al.*, 2007; Van Norstrand *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2002). L'effet de la mutation de la protéine GPDL1 pourrait passer par la phosphorylation du canal $Na_V1.5$ par la PKC induisant une diminution du courant sodique dépendant du voltage (Valdivia *et al.*, 2009).

L'activité des canaux sodiques Na_V peut être également modulée par des tyrosines kinases. L'activation de la kinase Fyn, membre de la famille des Src tyrosine kinases, par l'insuline induit un décalage de l'inactivation vers des potentiels moins dépolarisés sans modifier la courbe d'activation. Cet effet est annulé par un inhibiteur de src kinases ou par une mutation sur la boucle reliant les domaines III et IV (Ahern *et al.*, 2005). Des canaux sodiques phosphorylés sur des tyrosines ont été retrouvés sur des préparations de cœur de rat indiquant l'existence d'une telle régulation *in vivo* (Ahern *et al.*, 2005). Ce mécanisme a été renforcé par l'observation de l'augmentation du courant $Na_V1.5$ lors de la fixation d'EGF (Epidermal Growth Factor) sur son récepteur. Cette augmentation du courant est annulée par un inhibiteur du récepteur de l'EGF et potentialisée par un inhibiteur de PTP (protein tyrosine phosphatase) indiquant l'implication de phosphorylations de tyrosines et du récepteur EGFR possédant une activité tyrosine kinase (Liu *et al.*, 2007a). La modulation de l'activité des canaux Na_V par des tyrosines kinases est contrebalancée par des tyrosines phosphatases. Une analyse sur les interactions protéiques des 66 derniers acides aminés de la boucle C-terminale du canal

$Na_V1.5$ a permis d'identifier une interaction avec la tyrosine phosphatase PTPH1 (protein tyrosine phosphatase 1). Cette phosphatase décale la courbe d'inactivation du courant $Na_V1.5$ vers des potentiels plus hyperpolarisés et cet effet dépend du domaine PDZ (Jespersen *et al.*, 2006). La balance entre phosphorylation de résidus tyrosine du $Na_V1.5$ et tyrosine phosphatases est capable de réguler l'inactivation du canal. Certaines isoformes de canaux sodiques dépendants du voltage peuvent également être régulées par des kinases de la famille des MAP kinases (Mitogen activated protein kinase) telles que ERK ou p38 MAPK qui ont des rôles variés selon les isoformes de canaux Na_V (Scheuer, 2011).

De nombreuses protéines sont capables d'interagir avec les canaux sodiques dépendants du voltage et de moduler leur activité (Abriel, 2010; Catterall, 2010a; Shao *et al.*, 2009). Les protéines de la famille des FHF (fibroblast growth factor homologous factors) interagissent avec les canaux Na_V (Goetz *et al.*, 2009). La fixation de FHF1B sur le domaine C-terminal de $Na_V1.5$ induit une inactivation à des potentiels plus hyperpolarisés (Liu *et al.*, 2003). Une mutation sur le domaine de fixation de FHF1B sur le $Na_V1.5$ empêchant sa fixation est associée au syndrome de LQT3 (Liu *et al.*, 2003; Wehrens *et al.*, 2000).

Un motif IQ de fixation de la calmoduline est retrouvé sur toutes les isoformes de Na_V dont $Na_V1.5$ (Herzog *et al.*, 2003). Alors que certaines études ne montrent pas d'effet de la fixation de la calmoduline sur le canal $Na_V1.5$ (Deschenes *et al.*, 2002), d'autres démontrent une augmentation de l'inactivation (Kim *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2002). La protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline-dépendante CaMKII interagit et phosphoryle les canaux $Na_V1.5$ pour moduler leur activité (Wagner *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2009).

Les protéines de la famille de 14-3-3 sont connues pour se fixer sur les protéines membranaires et réguler leur localisation. Il a été montré que 14-3-3 interagit avec la boucle entre les domaines I et II de la sous-unité α du canal $Na_V1.5$. Sa fixation induit un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés sans modification de l'activation (Allouis *et al.*, 2006). Ces résultats mettent en évidence un rôle de 14-3-3 autre que la régulation de la localisation des protéines membranaires, dans la modulation de leurs propriétés.

D'autres protéines telles que la telethonin (Mazzone *et al.*, 2008), MOG1 (Wu *et al.*, 2008b) ou encore la Plakophilin (Sato *et al.*, 2009) sont connues pour interagir avec le $Na_V1.5$ et modifier son activité.

Enfin, dans les cardiomyocytes les canaux sodiques $Na_V1.5$ sont retrouvés dans des domaines membranaires enrichis en cavéoline. La cavéoline-3 interagit avec le canal $Na_V1.5$ et permet d'augmenter son activité (Yarbrough *et al.*, 2002). Des mutations dans le gène codant pour la cavéoline-3 sont impliquées dans le syndrome du LQT 9 (Vatta *et al.*, 2006) et dans la mort subite du nourrisson (Cronk *et al.*, 2007).

Les canaux sodiques apparaissent donc comme des protéines situées dans des macro-complexes membranaires liés au cytosquelette et aux radeaux lipidiques. Leur présence dans ces complexes permet une régulation de leur activité.

B. Rôle des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules non excitables

En plus de leur rôle dans les cellules excitables où les canaux sodiques dépendants du voltage sont responsables de la dépolarisation et de la propagation du potentiel d'action, l'expression de ces canaux a été retrouvée dans de nombreuses cellules non excitables où ils participent à des mécanismes variés.

1. Rôle physiologique dans les cellules non excitables

Les canaux sodiques sont exprimés dans les cellules neuronales où ils participent à l'excitabilité cellulaire mais sont également retrouvés dans des cellules gliales telles que la microglie (Chiu *et al.*, 1984) et les astrocytes (Sontheimer and Waxman, 1992). Il a été montré dans un modèle de sclérose en plaques (experimental autoimmune encephalomyelitis EAE) une augmentation de l'expression du canal $Na_V1.6$ dans les cellules de la microglie où il participe à l'activation de ces cellules (Craner *et al.*, 2005). L'inhibition des canaux Na_V des cellules microgliales diminue la phagocytose, la libération de cytokines, la migration et l'invasivité (Black and Waxman, 2012).

Des canaux sodiques dépendants du voltage sont exprimés dans des macrophages avec des répartitions différentes : l'isoforme $Na_V1.5$ est située dans les endosomes tardifs et l'isoforme $Na_V1.6$ est située dans le réticulum endoplasmique. $Na_V1.5$ est impliqué dans la phagocytose

et participe à l'acidification des endosomes suite à l'activation des macrophages par le lipopolysaccharide (LPS) (Carrithers *et al.*, 2007). De plus, le canal $Na_V1.6$ est capable de réguler l'invasivité cellulaire par un effet sur la formation des podosomes de macrophages et des invadopodes de cellules de mélanomes (Carrithers *et al.*, 2009). L'expression de l'isoforme $Na_V1.7$ a été retrouvée dans des cellules dendritiques matures puis son expression est diminuée lors de la maturation (Zsiros *et al.*, 2009). Les lymphocytes expriment également des canaux sodiques dépendants du voltage (DeCoursey *et al.*, 1985) où ils sont connus pour participer à la prolifération cellulaire, la maturation, la régulation du volume cellulaire et l'apoptose (Roselli *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que l'inhibition des canaux Na_V présents dans les cellules Jurkat, modèles de lymphocytes T humains, diminue leur invasivité (Fraser *et al.*, 2004).

Des canaux Na_V ont été retrouvés dans des cellules endothéliales (Gordienko and Tsukahara, 1994). Il a été montré que ces canaux participent à l'induction de ERK1/2 par les forces de cisaillement dans des cellules endothéliales ; le blocage de leur fonctionnement par un milieu sans sodium ou par la TTX diminue l'induction de ERK1/2 par les forces de cisaillement (Traub *et al.*, 1999). Il a été précisé que les canaux Na_V peuvent réguler les fonctions des cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) telles que la prolifération induite par le VEGF, la tubulogénèse et l'adhésion et que l'isoforme $Na_V1.5$ augmente l'activation de ERK1/2 induite par le VEGF (Andrikopoulos *et al.*, 2011).

Enfin, des courants sodiques dépendants du voltage sont retrouvés dans des fibroblastes (Bakhramov *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).

2. Rôle pathologique dans les cellules cancéreuses

Différentes 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 (Pancrazio *et al.*, 1989; Roger *et al.*, 2007), de leucémies (Schlichter *et al.*, 1986), de cancer du sein (Fraser *et al.*, 2005; Roger *et al.*, 2003), de mesothéliome (Fulgenzi *et al.*, 2006), de neuroblastome (Urbano *et al.*, 1997), de cancer du col de l'utérus (Diaz *et al.*, 2007), et de mélanome (Allen *et al.*, 1997) où elles participent principalement, lorsque cela a été étudié, au phénomène d'invasivité cellulaire.

Des courants sodiques activés par le voltage ont initialement été mis en évidence dans des cellules de cancer de prostate de rat puis humaines (Grimes *et al.*, 1995; Laniado *et al.*, 1997). Dans les deux cas ces courants sont enregistrés dans des cellules cancéreuses fortement invasives mais pas dans des cellules faiblement invasives. L'inhibition de leur activité par la TTX réduit l'invasivité des cellules (Grimes *et al.*, 1995; Laniado *et al.*, 1997). Ces courants ont été caractérisés et sont dus à une isoforme TTX-sensible (Grimes and Djamgoz, 1998). Il semblerait qu'il s'agisse de l'isoforme neuronale $Na_V1.7$ dans son variant d'épissage néonatal (Diss *et al.*, 2001). Il existe par ailleurs une corrélation entre l'expression de ce canal $Na_V1.7$ et l'invasivité des cellules (Smith *et al.*, 1998). Dans ces cellules cancéreuses prostatiques, le canal $Na_V1.7$ en plus de son rôle dans l'invasivité semble être impliqué dans la galvanotaxie (Djamgoz *et al.*, 2001), la sécrétion (Mycielska *et al.*, 2003) et la motilité mais ne régule pas la prolifération cellulaire (Fraser *et al.*, 2003). Des études sur l'expression de ce canal *in vivo* ont permis de proposer que l'expression de $Na_V1.7$ pouvait être un marqueur de métastases dans les cancers de la prostate (Diss *et al.*, 2005). Dans un modèle de tumeurs induites par l'injection de cellules cancéreuses prostatiques exprimant le canal $Na_V1.7$ chez des rats, l'injection de TTX au niveau de la tumeur primaire diminue le nombre de métastases dans le foie et augmente la survie des rats sans modifier la masse de la tumeur primaire (Yildirim *et al.*, 2012).

L'activité du canal plus que l'isoforme semble importante pour réguler l'invasivité. En effet, la transfection de l'isoforme $Na_V1.4$ dans des cellules de cancer de la prostate augmente l'invasivité de ces cellules (Bennett *et al.*, 2004).

Des canaux Na_V dépendants du voltage ont également été retrouvés dans des cellules et biopsies cancéreuses mammaires (Fraser *et al.*, 2005; Roger *et al.*, 2003). Les cellules cancéreuses mammaires humaines hautement invasives de la lignée MDA-MB-231 expriment un canal sodique dépendant du voltage qui est fonctionnel et donne naissance à un courant sodique rapide. Ce courant peut seulement être enregistré dans les cellules MDA-MB-231 et non dans les cellules non cancéreuses MCF-10A ni dans les cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives MCF-7 et MDA-MB-468 (Fraser *et al.*, 2005; Roger *et al.*, 2003). Le courant entrant est activé vers -55 mV, présente un maximum de courant à -5 mV et s'inverse vers + 60 mV correspondant au potentiel d'équilibre du sodium (Figure 18). La superposition des courbes de disponibilité et de conductance met en évidence une zone de potentiels de membrane où les canaux sont activables mais pas totalement inactivés (fenêtre de voltage,

Figure 18). Le potentiel de membrane des cellules se situe vers -36,8 ± 1,5 mV et se trouve dans cette zone de fenêtre conduisant à une entrée continue de sodium dans les cellules par un courant dit « de fenêtre » (Gillet *et al.*, 2009). Le courant enregistré dans les cellules MDA-MB-231 se compose donc d'une composante transitoire, rapidement inactivée et d'un courant persistant de fenêtre, qui sont tous les deux bloqués par la TTX à des concentrations supérieurs au µM (canal TTX-résistant) (Figure 18).

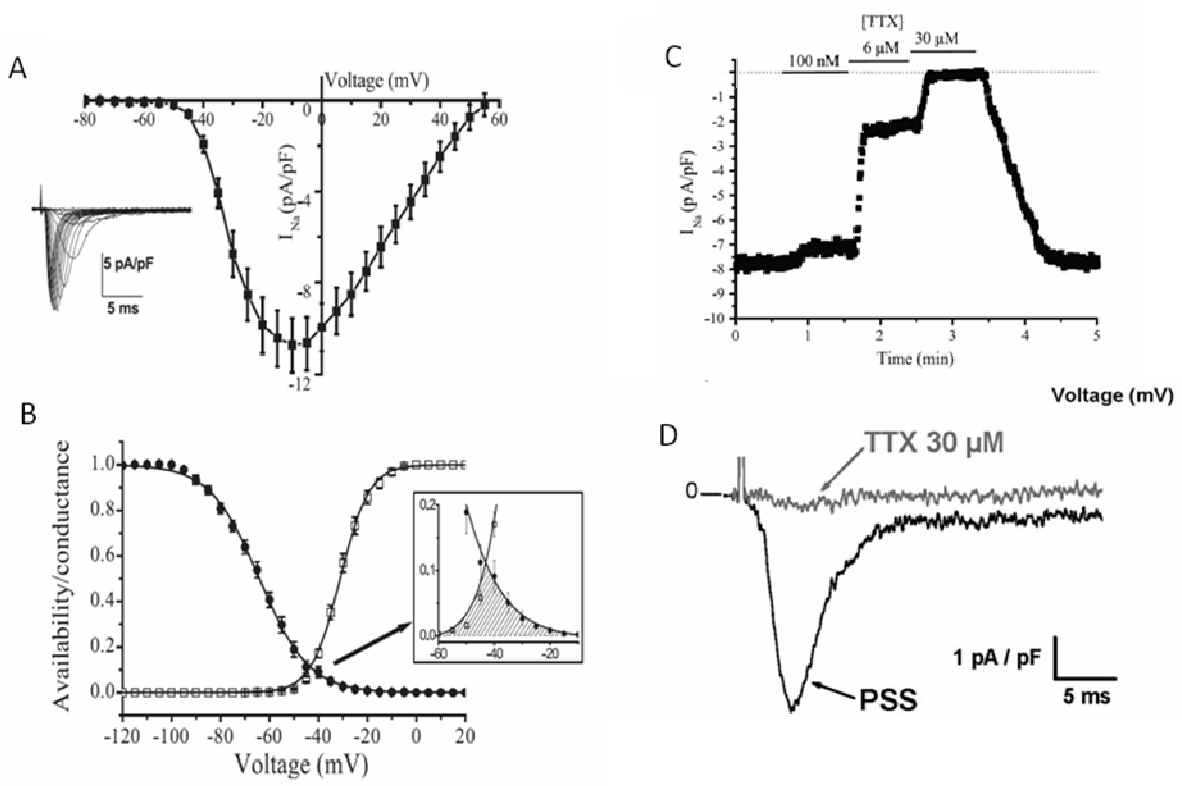


Figure 18 : Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux sodiques dépendants du voltage présents dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

A courbe courant-voltage. B. courant de fenêtre. C. sensibilité à un inhibiteur pharmacologique la TTX. D. Courant transitoire et courant de fenêtre. D'après Roger *et al.*, 2003 et Gillet *et al.*, 2009.

L'étude des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant ainsi que sa sensibilité à la TTX dans un premier temps (Roger *et al.*, 2003), puis l'utilisation de siRNA (Gillet *et al.*, 2009) ont permis de montrer que l'isoforme responsable du courant sodique dépendant du voltage dans les cellules MDA-MB-231 était l'isoforme $Na_V1.5$ décrite comme étant l'isoforme majoritairement exprimée dans le cœur. Il s'agit d'un variant d'épissage néonatal de cette isoforme (Fraser *et al.*, 2005). L'exon 6 codant pour une partie de la région S3-S4 du

domaine DI est dupliqué en tandem dans plusieurs isoformes de canaux Na_V (Copley, 2004). Un épissage alternatif permet de déterminer quel exon sera présent ; l'exon situé en 5' ou exon 6a est exprimé dans les tissus fœtaux et est remplacé après la naissance par l'exon situé en 3' ou exon 6b (Fraser *et al.*, 2005). L'isoforme $Na_V1.5$ néonatale exprimée dans les cellules MDA-MB-231 possède l'exon 6a induisant une substitution de 7 acides aminés. Le canal néonatal présente une activation pour des potentiels plus dépolarisés, des cinétiques d'activation et d'inactivation plus lentes, un retour de l'inactivation plus lent et une diminution de la disponibilité du canal, comparé au courant $Na_V1.5$ adulte (Onkal *et al.*, 2008). Cette isoforme pourrait être responsable de la sensibilité particulière à des bloqueurs de canaux calciques observée dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231 (Roger *et al.*, 2004). La raison pour laquelle un canal néonatal cardiaque est exprimé dans des cellules cancéreuses mammaires n'est pas élucidée fait certainement intervenir une régulation transcriptionnelle ou épigénétique.

Le canal $Na_V1.5$ exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231 participe à l'invasivité cellulaire alors qu'il ne semble pas réguler la prolifération ni la migration cellulaire (Roger *et al.*, 2003). L'inhibition du canal $Na_V1.5$ par la TTX ou par un siRNA réduit d'environ 30 % l'invasivité des cellules MDA-MB-231. La TTX n'a 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). L'augmentation du courant de fenêtre par la vératridine, inhibiteur de l'inactivation du canal, augmente l'invasivité des cellules et cet effet peut être bloqué par la TTX. De plus l'inhibition du canal réduit la taille de colonies de cellules MDA-MB-231 cultivées en trois dimensions dans une matrice extracellulaire et réduit également le nombre de cellules s'échappant de ces colonies suggérant que l'activité de ce canal pourrait avoir un rôle dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique *in vivo* (Gillet *et al.*, 2009). Il a été montré que l'activité de la protéine est nécessaire pour l'effet observé sur l'invasivité puisque l'inhibition moléculaire du canal par un siRNA spécifique abouti à une même diminution de l'invasivité que l'inhibition pharmacologique par la TTX (Gillet *et al.*, 2009). De plus, lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu contenant une faible concentration en sodium, l'invasivité est diminuée et la TTX a moins d'effet sur l'invasivité (Gillet *et al.*, 2009). L'influx de sodium par le canal $Na_V1.5$ semble donc important dans l'invasivité des cellules MDA-MB-231. L'existence d'un courant de fenêtre au potentiel de membrane des cellules cancéreuses a été confirmée dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules où le potentiel de membrane des

cellules se situe également dans la zone de fenêtre induisant une entrée continue de sodium dans les cellules (Roger *et al.*, 2007).

Ces résultats obtenus *in vitro* sont appuyés et rendus importants par l'observation d'une corrélation entre l'expression des canaux $Na_V1.5$ sur des biopsies de patientes atteintes de cancer du sein avec l'envahissement ganglionnaire et donc la progression du cancer (Fraser *et al.*, 2005). De plus, l'expression du gène *SCN5A* est augmentée dans les tissus cancéreux mammaires comparés à des tissus normaux dans plusieurs banques de données (Yang *et al.*, 2012). L'expression de ce gène est augmentée chez des patientes ayant eu une rechute ou décédées dans les 5 ans et la surexpression de *SCN5A* est associée à un risque augmenté de développer des métastases (Yang *et al.*, 2012). Cette même étude s'est intéressée à un bloqueur de canaux sodiques dépendants du voltage utilisé comme anticonvulsivant, la phénytoïne. Cette molécule est capable d'inhiber le courant transitoire et de fenêtre des cellules MDA-MB-231 induisant une diminution de la migration et de l'invasivité cellulaire à des concentrations utilisées pour traiter l'épilepsie (Yang *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que cette molécule pourrait être un potentiel outil thérapeutique contre le développement de métastases.

L'activité du canal $Na_V1.5$ favorise l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire par ces cellules cancéreuses (Gillet *et al.*, 2009). Cette dégradation protéolytique implique l'activité de protéases. Il a été mis en évidence que les cathepsines à cystéine B et S sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire induite par le canal $Na_V1.5$. L'activité du canal $Na_V1.5$ ne régule pas l'expression ni la sécrétion de ces cathepsines mais pourrait jouer sur leur activation. En effet, ces protéases sont connues pour avoir une activité maximale à pH acide. La diminution de l'activité du canal $Na_V1.5$ par la TTX induit une acidification intracellulaire accompagnée d'une alcalinisation péricellulaire (Gillet *et al.*, 2009). Dans ce modèle, le canal sodique $Na_V1.5$ serait capable (indirectement) d'augmenter l'acidification péricellulaire favorable à l'activité des cathepsines à cystéines B et S et donc pourrait contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. C'est sur ces bases qu'a été développé mon projet de thèse, afin de poursuivre l'étude de l'implication des canaux $Na_V1.5$ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires.

Deuxième partie
Matériel et méthodes

I. Techniques de culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

Les cellules utilisées lors de cette étude sont toutes des lignées de cellules épithéliales mammaires humaines provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC, USA). La lignée de cellules épithéliales non cancéreuses MCF-10A (CRL-10317™) est issue d'une mammoplastie et a été immortalisée par culture à long terme dans un milieu sans sérum contenant une faible concentration de calcium (Soule *et al.*, 1990). Ces cellules ne sont pas tumorigéniques lorsqu'elles sont implantées dans des souris immunodéprimées. Les lignées de cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 (HTB-26™), MDA-MB-435s (HTB-129™) et MCF-7 (HTB-22™) sont issues de métastases présentes dans des épanchements pleuraux de patientes atteintes d'adénocarcinomes mammaires métastatiques (Cailleau *et al.*, 1974; Cailleau *et al.*, 1978; Soule *et al.*, 1973). Elles diffèrent notamment dans l'expression des récepteurs nucléaires aux œstrogènes de type ER et des récepteurs nucléaires à la progestérone ; la lignée MCF-7 exprime ces deux types de récepteurs alors que les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-435s n'en expriment pas et sont alors utilisées comme modèles de cellules cancéreuses mammaires hormono-indépendantes. De plus, les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-435s ne surexpriment pas l'oncogène codant pour la protéine HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor-2**)** et sont donc utilisées comme modèles de cellules cancéreuses triple négatives (Davison *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 1997). Les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-435s sont connues pour former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéprimées tandis que les cellules MCF-7 ne sont tumorigéniques qu'en présence d'une supplémentation en œstrogènes (Cailleau *et al.*, 1978; Price *et al.*, 1990; Soule and McGrath, 1980). Les cellules MDA-MB-231 sont considérées comme plus invasives que les cellules MCF-7 ; elles sont connues pour migrer et envahir de façon plus importante *in vitro* (Roger *et al.*, 2003). Dans le cadre de cette étude, les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231 ont été utilisées pour leur propriété d'exprimer un canal sodique fonctionnel dépendant du voltage le $Na_V1.5$ alors que les cellules non cancéreuses MCF-10A, les cellules cancéreuses à faible potentiel invasif MCF-7,et les cellules cancéreuses MDA-MB-435s ne possèdent pas de courants sodiques dépendants du voltage (Fraser *et al.*, 2005; Roger *et al.*, 2003).

Afin d'étudier l'implication du canal $Na_V1.5$ dans les cellules MDA-MB-231, une lignée de cellules exprimant de manière stable un shRNA (small hairpin RNA) dirigé contre $Na_V1.5$ ($shNa_V1.5$) a été construite au laboratoire par transduction lentivirale. Ce shRNA permet de détruire spécifiquement les ARN messagers (ARNm acide ribonucléique messager) du canal $Na_V1.5$ et donc d'en inhiber l'expression (Virginie Driffort mémoire de Master 2). Les cellules shRNA contre $Na_V1.5$ sont comparées à une lignée contrôle obtenue par transfection stable d'un shRNA contrôle ne ciblant aucune séquence ARNm connue (shCTL).

B. Intérêts, limites et conditions nécessaires à la culture cellulaire

1. Intérêts et limites de la culture cellulaire

L'utilisation de lignées de cellules en culture est d'un intérêt majeur dans le cadre d'une étude mécanistique portant sur les propriétés de cellules cancéreuses invasives. Ces lignées de cellules cancéreuses sont faciles à entretenir du fait de leur moins grande sensibilité comparée aux cultures primaires et il est également aisé d'en obtenir un nombre conséquent grâce à leur propriété de prolifération accrue. La culture de lignées cellulaires cancéreuses est un moyen d'obtenir un modèle simple d'étude *in vitro* dans le milieu artificiel du laboratoire. Ces cultures de cellules cancéreuses sont nécessaires à l'analyse de mécanismes cellulaires et moléculaires mais possèdent certaines limites dues aux différences entre les lignées cellulaires et la tumeur accompagnée de l'environnement tumoral. L'étroite relation entre les cellules cancéreuses et l'environnement tumoral n'est pas représentée par la culture d'une lignée de cellules cancéreuses. Contrairement à une tumeur qui se retrouve le plus souvent dans des conditions d'hypoxie et de déplétion en nutriments du fait de l'éloignement des vaisseaux sanguins, les cellules sont cultivées en présence d'une grande quantité de glucose et de nutriments présents dans le milieu de culture qui est renouvelé régulièrement et dans une atmosphère normoxique. Le tissu tumoral est un milieu acide de par son métabolisme particulier alors que les cellules sont cultivées dans un milieu tamponné à un pH de 7,4. Une autre limite de l'utilisation de la culture cellulaire est la grande adaptabilité des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à un grand nombre de facteurs de stress et du fait de leur capacité de prolifération importante il est possible de sélectionner une population de cellules possédant des caractéristiques différentes de la

population clonale initiale. Il est donc primordial afin d'éviter tout biais de sélection de contrôler au mieux les conditions de culture cellulaire et de remettre en culture régulièrement de nouvelles cellules issues du stock initial.

Les lignées de cellules cancéreuses représentent un outil indispensable pour l'étude de mécanismes cellulaire et moléculaires mais possèdent certaines limites. Les résultats obtenus *in vitro* nécessitent donc d'être confirmés et approfondis par des analyses de tissus cancéreux et/ou des expérimentations *in vivo*.

2. Conditions de culture cellulaire

Les conditions de culture cellulaire ont besoin d'être contrôlées au mieux afin d'éviter tout risque de contamination des cellules par des organismes bactériens ou fongiques et tout risque de dérive de la population cellulaire. Pour cela la culture cellulaire est effectuée dans une salle dédiée la plus propre possible et possédant un sas. Les manipulations sont effectuées de manière stérile sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), avec du matériel préalablement autoclavé et des solutions achetées stériles ou filtrées à l'aide d'un filtre de 0,2 µm permettant la rétention d'un grand nombre de bactéries. L'absence d'antibiotiques dans le milieu de culture permet de détecter plus rapidement les contaminations bactériennes et d'éliminer les cultures cellulaires le cas échéant. Certains antibiotiques tels que les macrolides ou les aminoglycosides sont également connus pour modifier l'activité de certains canaux ioniques. Des tests de détection des mycoplasmes sont également réalisés de manière régulière.

La morphologie des cellules ainsi que quelques propriétés telles que la prolifération ou la présence et l'activité de certaines protéines sont contrôlées régulièrement afin de s'assurer du bon entretien des cellules et de l'absence de croisement avec d'autres lignées. En dehors des manipulations, les boites contenant les cellules sont placées dans une étuve à atmosphère contrôlée saturée en humidité à une température de 37°C et contenant 5 % de dioxyde de carbone (CO_2) afin de maintenir le pH à l'aide du système tampon bicarbonate.

3. Milieux de culture

Les cellules cancéreuses mammaires sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, USA) supplémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF). Le milieu DMEM contient 4,5 g / L de D-glucose, 584 mg / L de glutamine, 3,7 g / L de bicarbonate de sodium ainsi que tous les acides aminés de la série L et des vitamines nécessaires à la survie des cellules. L'osmolarité du DMEM est comprise entre 324 et 352 mOsm et le pH est tamponné entre 7 et 7,4 grâce au tampon bicarbonate. En effet, ce système permet le maintien du pH d'une solution suivant la réaction : $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$, ce qui nécessite une atmosphère de culture cellulaire contenant 5 % de CO_2. Le rouge de phénol présent dans le DMEM sert d'indicateur de pH ; il est rouge autour de 7,4 et devient jaune en cas d'acidification ou violacé lors d'une alcalinisation. Le SVF ajouté au milieu de culture apporte des facteurs de croissance et des cytokines nécessaires au développement des cellules. Les cellules non cancéreuses MCF-10A sont cultivées dans du milieu DMEM : F12 (1 :1) (Lonza, USA) supplémenté par 5 % de sérum de cheval, 10 mg / mL d'insuline, 20 ng / mL d'EGF (Epidermal Growth Factor), 0,5 mg / mL d'hydrocortisone et 100 ng / mL de toxine cholérique.

4. Solutions utilisées pour mettre en suspension les cellules

Une solution de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Tableau II) (DPBS) (Lonza, USA) ne contenant ni calcium ni magnésium est utilisée pour laver les cellules avant de les décoller de leur support. Son pH est compris entre 7,3 et 7,7 et son osmolarité est de 271 à 287 mOsm.

Tableau II : Composition du DPBS

COMPOSITION EN	mg / L
KCl	200
KH_2PO_4	200
NaCl	8000
Na_2HPO_4, 7 H_2O	2160
glucose	1000
pyruvate de sodium	36

Les cellules sont décollées du support de culture cellulaire et mises en suspension à l'aide d'un mélange de trypsine-EDTA (Tableau III) (Ethylenediaminetetraacetic acid) (ou trypsine-

Versene®) (Lonza, USA) permettant de déstabiliser les jonctions entre les cellules et entre les cellules et le support. Le pH de cette solution est compris entre 7,10 et 7,90 et son osmolarité est de 269 à 297 mOsm.

Tableau III : Composition de la solution de trypsine-EDTA

COMPOSITION EN	mg / L
glucose	1000
KCl	400
NaCl	8000
$NaHCO_3$	580
rouge de phénol	2
trypsine	500
EDTA	200

5. Supports utilisés pour la culture cellulaire

Les cellules sont le plus souvent cultivées dans des flacons de culture stériles de 25, 75 ou 175 cm² (BD Biosciences, France). Ces flacons ont été soumis à un traitement qui a rendu leur surface hydrophile permettant d'augmenter l'attachement des cellules au plastique. Ces flacons possèdent un bouchon qui comporte un filtre poreux de 0,2 µm afin de laisser passer les gaz mais d'empêcher les contaminants de passer. Les cellules peuvent également être cultivées dans des plaques 6 ou 24 puits (BD Biosciences, France) dans le cas ou un nombre peu élevé de cellules est suffisant. Les cellules destinées à des mesures d'électrophysiologie par patch clamp sont ensemencées dans des boites de Petri de 35 mm de diamètre (Réf. 430165 Corning, Thermo Fischer Scientific, France). Dans le cas des tests de migration et d'invasion, les cellules sont ensemencées dans des inserts eux-mêmes déposés dans une plaque pouvant recevoir ces inserts (Réf. 353504 BD Biosciences, France).

Pour la culture des cellules destinées à des mesures de fluorescence, afin de limiter les problèmes liés à l'auto-fluorescence du plastique, les cellules sont cultivées sur des boites pourvues d'une surface de culture en verre. Dans le cas de mesure de pH par une sonde fluorescente, les cellules sont cultivées sur des boites de Petri à fond en verre d'un diamètre de 35 mm avec une surface de culture de 23 mm (Fluorodish™ Réf. FD35-100 WPI, France). Pour l'immunocytochimie, les cellules sont cultivées sur un système de lame de verre compartimenté permettant plusieurs conditions sur une même lame (Lab-tek™ II BD

Biosciences, France). Les préparations sont ensuite recouvertes d'une lamelle couvre-objet d'une épaisseur de 0,17 mm.

Dans le cas de l'étude de l'invasivité cellulaire, la culture des cellules doit se rapprocher le plus possible de l'environnement de la tumeur. Les supports plastiques ne représentant pas au mieux l'environnement tumoral, une couche de Matrigel™ (composition cf. Tableau IV) ou de gélatine peut être utilisée pour recouvrir les surfaces de culture et ainsi mimer la matrice extracellulaire. La gélatine (Sigma, France) a été utilisée pour recouvrir des boites de Petri de 150 mm de diamètre (BD Biosciences, France) d'une fine couche permettant la formation et l'isolement des invadopodes. Cette surface a été choisie pour sa rigidité supportant un grattage doux de la surface afin de séparer les corps cellulaires des invadopodes. Dans le cas d'identification par immunofluorescence des invadopodes, le Matrigel™ (Réf. 356234 BD Biosciences, France) a été préféré à la gélatine pour sa plus grande proximité avec l'environnement extracellulaire tumoral. Le Matrigel™ est une membrane basale soluble issue du sarcome murin Engelbreth-Holm-Swarm. Cette matrice en se solidifiant forme une couche de composition, de structure et de propriétés physiques équivalentes à celles de la membrane basale.

Tableau IV : Composition du Matrigel™

COMPOSITION DU MATRIGEL™	EN POURCENTAGE
laminine	60
collagène IV	30
entactine	8
protéoglycane de sulfate d'héparane (perlecan)	Présence
facteurs de croissance (PDGF, EGF, TGF-β)	Présence
métalloprotéinases matricielles	Présence

6. Inhibiteurs pharmacologiques

La tétrodotoxine (TTX, Latoxan, France), isolée à partir de poissons de la famille des Tetraodontidae est utilisée à une concentration de 30 µM pour bloquer le courant sodique $Na_V1.5$. Elle est remise en solution à une concentration de 3 mM dans de l'eau légèrement acidifiée à l'aide d'acide acétique dilué au millième. L'action de la TTX étant réversible à plus

de 95 %, elle est donc ajoutée extemporanément à chaque étape de la préparation des cellules. L'inhibiteur de l'échangeur sodium-proton utilisé est un dérivé de l'amiloride, le 5-N-ethyl-N-isopropyl amiloride (EIPA, Sigma, France) et est dilué dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde). Cet inhibiteur est utilisé à une concentration de 10 µM pour les mesures de pH intracellulaire (pH_i) et de 1 µM pour la migration et l'invasion. L'isoforme 1 des échangeurs sodium-proton (NHE1) a été inhibée par 5 µM de cariporide solubilisé dans du DMSO (HOE642, don de Sanofi Aventis) connu pour être plus spécifique de NHE1 que l'EIPA. L'activité de la V-ATPase est inhibée par 100 nM de bafilomycine A1 (Sigma, France) diluée dans du DMSO. Les transporteurs de bicarbonates sont inhibés par 100 mM d'acide 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonique (DIDS, Sigma, France) solubilisé dans du DMSO. Les protéases à cystéines sont inhibées à l'aide de 100 µM d'E-64 dilué dans de l'eau distillée (Calbiochem, Millipore France). La PKA est activée à l'aide de Forskoline (Sigma, France) diluée dans du DMSO et utilisée à une concentration de 30 µM. La PKA est inhibée par 0,5 µM de KT5720 (Sigma, France) dilué dans du DMSO. L'anisomycine (Sigma, France) à une concentration de 100 nM (diluée dans du DMSO) est utilisée pour activer p38 MAPK. La polymérisation de l'actine a été déstabilisée par un traitement des cellules avec 0,5 µM de cytochalasine D (Thermo Fischer Scientific, France) pendant 30 minutes à 37°C.

C. Protocoles de culture cellulaire

1. Cryogénisation et décryogénisation des cellules

Afin d'éviter tout risque de dérive des populations cellulaires, les cellules sont conservées dans de l'azote liquide et décongelées régulièrement 20 passages après la dernière décongélation. La congélation s'effectue lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Elles sont récoltées par trypsination puis centrifugées à 700 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est immédiatement remis en suspension dans le milieu de cryoconservation composé de 10 % de DMSO (agent cryoprotecteur), de 30 % de SVF et de 60 % de DMEM. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans des tubes adaptés à la cryogénie à une densité de 1 à 1,5 millions de cellules par tube dans 1 mL. La congélation des tubes se fera de façon lente, d'abord à -80°C puis après 24h dans l'azote liquide à -196°C, afin d'éviter la formation de cristaux de glace dans le cytoplasme des cellules, l'agent cryoprotecteur limitant les effets de la déshydratation sur les cellules. Avant chaque cryogénisation, l'absence de

contamination par des mycoplasmes ou des bactéries est vérifiée. La décryogénisation s'effectue de façon rapide toujours afin de limiter la formation de cristaux de glace dans le milieu intracellulaire. Le tube contenant les cellules est rapidement réchauffé dans un bain à 37°C puis les cellules sont transférées dans un flacon de 75 cm² contenant du milieu de culture préalablement équilibré en pH et en température. Le milieu de culture est renouvelé après 24h pour retirer le DMSO pouvant être toxique pour les cellules en cultures.

2. Mise en suspension et entretien des cellules

Les cellules doivent être décollées du support de culture lorsqu'elles atteignent environ 90 % de confluence et quand il est nécessaire de les ensemencer ou de les recueillir pour une expérience. La technique la plus courante est l'utilisation de trypsine, une enzyme protéolytique appartenant à la famille des protéases à sérine, pour dissocier de manière enzymatique les contacts entre les cellules et entre les cellules et le support. Les cellules sont tout d'abord « lavées » deux fois avec du DPBS sans calcium ni magnésium afin d'éliminer les protéines qui se trouvent dans le sérum et qui pourraient empêcher l'action de la trypsine. Le DBPS permet également d'éliminer le calcium du milieu pour faciliter la dissociation des cellules. Un volume suffisant de solution de trypsine-EDTA pour recouvrir la surface de culture (8 µL / cm²) est alors déposé dans les boites. La trypsine par son action enzymatique rompt les jonctions entre les cellules et dissocie les adhérences avec le support. La solution contenant la trypsine ne contient ni calcium ni magnésium et comporte également un chélateur de ces ions divalents, l'EDTA permettant de rompre les jonctions nécessitant du calcium. Après quelques minutes à température ambiante (environ 2 à 5 minutes selon les lignées), l'ajout de milieu de culture permet d'arrêter l'action de la trypsine en saturant les sites actifs par apport d'autres protéines. L'inconvénient de la trypsine est qu'il s'agit d'une enzyme capable de cliver les domaines extracellulaire des protéines membranaires, c'est pourquoi les cellules sont utilisées au minimum 24 à 48h après leur trypsination. Des flacons d'entretien sont mis en culture pour lesquels le milieu de culture est changé deux fois par semaine. La numération de la suspension cellulaire obtenue est indispensable pour pouvoir ensemencer les cellules à la densité optimale pour l'expérimentation prévue. Le comptage s'effectue sur une cellule de numération de type Malassez (1 bande = 0,1 mm^3, la cellule = 1 mm^3).

II. Techniques de biologie moléculaire

A. Analyse de l'expression des ARN messagers d'intérêts

1. Extraction des ARN totaux

Les ARN (acides ribonucléiques) totaux sont extraits à l'aide du kit Total RNA isolation NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel, France) suivant le protocole du fabriquant. L'extraction s'effectue à partir d'une suspension de 500 000 cellules, préalablement lavées avec du DPBS. Les cellules sont lysées par une solution contenant des agents chaotropiques permettant d'inactiver les ribonucléases (sels de guanidine), et réducteurs le β-mercaptoethanol (1 %) ainsi que de l'éthanol à 70 %, cette solution ayant une composition permettant de fixer les ARN sur une colonne de silice. L'échantillon est alors déposé sur la colonne de silice puis les sels sont éliminés pour permettre une meilleure action de la DNase. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est détruit par l'addition d'une DNase recombinante pendant 15 minutes à température ambiante. Plusieurs lavages permettent d'éliminer les composants cellulaires puis les ARN purs sont élués dans de l'eau sans RNase. Les échantillons d'ARN totaux sont conservés à -20°C pour un stockage de court terme et à -80°C pour un stockage plus long.

Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie pour estimer leur concentration et s'assurer de leur qualité. Pour cela, une dilution d'ARN au 1/50ème est préparée dans de l'eau et les absorbances sont mesurées à 260, 280 et 230 nm. Les acides nucléiques (ADN et ARN) absorbent la lumière à 260 nm ce qui permet de connaître leur concentration. En effet, une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg / mL d'ARN total. Le rapport des absorbances à 260 et 280 nm (absorbance des acides aminés aromatiques) reflète la contamination protéique, il doit être supérieur ou égal à 1 et de préférence proche de 2. Le rapport des absorbances à 260 et 230 nm correspond au reflet de la contamination par les solvants d'extraction, en particulier la guanidine. Ce rapport doit être supérieur à 1,5 pour des ARN purs.

2. Transcription inverse des ARN en ADN complémentaire

La transcription inverse d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée par une ADN polymérase ARN dépendante (reverse transcriptase) en présence d'amorces oligonucléotidiques. L'hétéroduplex ARN / ADNc ainsi créé peut être utilisé comme substrat pour une réaction de polymérisation en chaîne après sa dénaturation.

L'extraction puis la quantification des ARN totaux permet de préparer une solution de 32 µL contenant 2,5 µg d'ARN dans le but d'effectuer la transcription inverse (RT) des ARN en ADNc. Cette étape est réalisée à l'aide du kit Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, France). Ce kit contient sous forme de billes lyophilisées les dNTP, une reverse transcriptase d'origine murine (FPLCpure™), de l'albumine bovine et un inhibiteur de ribonucléases (RNAguard™). Les ARN sont préalablement dénaturés par un chauffage de 10 minutes à 65°C puis refroidis 2 minutes dans de la glace et transférés dans les tubes réactionnels du kit. Les amorces utilisées correspondent à des hexanucléotides de séquences aléatoires (random primers pd(N)$_6$ 5'-Phosphate, Réf. 27216601, Amersham Biosciences, GE Healthcare, France) qui peuvent se fixer de manière aléatoire à leur séquence complémentaire sur tous les ARN présents dans la solution. Après addition de 1 µL d'amorces d'hexanucléotides aléatoires, pd(N)6 (0,2 µg par tube), la réaction s'effectue pendant 1h à 37°C.

3. Réaction de polymérisation en chaîne

a) Principe de la PCR conventionnelle

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR permet d'amplifier *in vitro*, en un grand nombre de copies, un fragment spécifique d'ADN connu à partir d'un faible nombre d'exemplaires de cet acide nucléique (Mullis *et al.*, 1986). Cette technique est basée sur les propriétés d'hybridation et de déshybridation des acides nucléiques en fonction de la température et de la capacité de synthèse d'ADN par une ADN polymérase ADN-dépendante thermostable, la Taq polymérase. La réaction de PCR s'effectue en présence de l'ADN contenant la séquence à amplifier, de deux amorces complémentaires de la séquence à amplifier, de nucléotides et de la Taq polymérase et conduit à une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible (Figure 19). Les hautes températures utilisées lors des différentes étapes de la PCR nécessitent une ADN polymérase thermorésistante. Les ADN polymérases

thermorésistantes initialement isolées à partir de bactéries thermophiles (vivant en milieu extrême) telles que Thermus aquaticus (Taq polymérase), sont actuellement recombinantes.

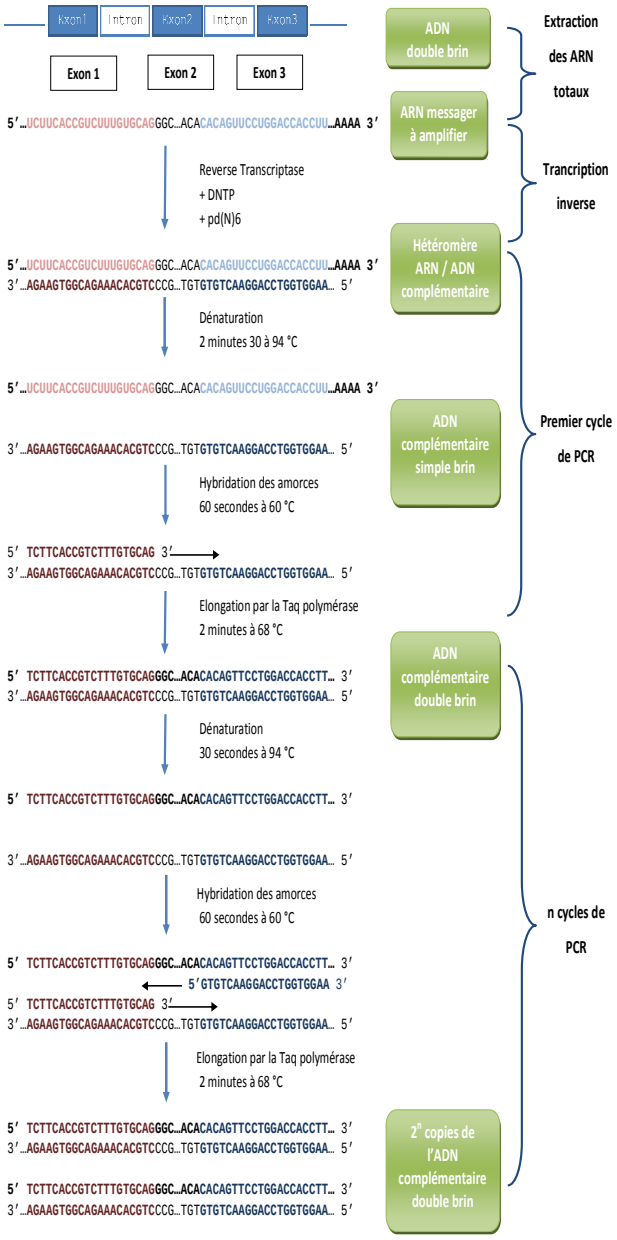


Figure 19 : Principe de la réaction de polymérisation en chaîne.

Une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C permet de déshybrider les structures doubles brin et de déstabiliser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et de dénaturer les enzymes autres que la Taq polymérase qui pourraient se retrouver dans le mélange. Ensuite chaque cycle de PCR commence par une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C permettant de déshybrider les ADN et les

amorces et de détacher l'ADN polymérase. Cette étape est suivie d'une étape d'hybridation des amorces sur leurs séquences complémentaires pendant 60 secondes à 60°C, température qui est thermodynamiquement favorable à l'hybridation des amorces mais pas à l'hybridation des brins d'ADN complémentaires. Enfin la dernière étape de polymérisation d'ADN complémentaire à l'ADN matrice par l'ADN polymérase thermostable à partir de dNTPs est réalisée pendant 2 minutes à 68°C, une température qui est favorable à la polymérase. La synthèse d'ADN s'effectue de l'extrémité 5' phosphate vers l'extrémité 3' qui possède un OH libre pour former une nouvelle liaison phosphodiester. L'amplification exponentielle de l'ADNc s'effectue en général en 30 à 40 cycles.

Il existe deux possibilités d'effectuer une réaction de PCR : soit en point final soit en temps réel. Dans le cas de la PCR en point final, plus la quantité d'ADN initiale est importante, plus le nombre d'amplicon sera élevé. Cette technique est semi-quantitative (lorsqu'une gamme d'ADNc est utilisée simultanément) puisque la quantité d'ADN obtenu à la fin des 40 cycles peut déjà avoir atteint un plateau. La PCR en temps-réel permet de suivre à chaque cycle l'amplification de l'ADN et non seulement en point final. La quantification, relative ou absolue en présence d'une gamme de différentes concentrations d'ADNc, peut alors s'effectuer dans la phase exponentielle de la synthèse d'ADN.

b) Choix des amorces de PCR

La conception d'amorces pour la PCR nécessite plusieurs étapes et vérifications afin de s'assurer de la réussite et de la qualité de l'amplification à effectuer. Les banques de données ont permis de connaître les séquences d'ADNc des gènes d'intérêt à amplifier (Ensembl Genome Browser http://www.ensembl.org/index.html, Consensus Coding Sequences CCDS http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi). Le logiciel en ligne gratuit Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/) permet à partir de la séquence d'ADNc à amplifier de construire plusieurs couples d'amorces en fonction de critères imposés. Afin de concevoir des amorces pour PCR plusieurs critères doivent être remplis : la taille du fragment à amplifier, la taille des amorces (environ 20 nucléotides), le pourcentage de GC doit être supérieur à 50 % et la température d'hybridation des amorces (proche de 60°C, et la plus proche possible entre les deux amorces). Les amorces sont conçues de manière à s'hybrider de façon complémentaire à l'ADN à amplifier et se situent de préférence sur deux exons différents. Les amorces doivent également ne pas former de structures secondaires et la complémentarité entre amorce doit

être évitée afin de ne pas former de dimères d'amorces qui empêcheraient l'accessibilité des amorces à l'ADN à amplifier. La spécificité des paires d'amorces choisies est vérifiée à l'aide du logiciel Blast (BLAST pour Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Ce logiciel permet à partir des paires d'amorces choisies de vérifier si ces amorces sont complémentaires de la séquence d'intérêt et non d'une autre séquence. Les amorces choisies sont présentées dans le Tableau V.

Tableau V : Amorces utilisées pour la PCR.

NOM DU GENE	NOM DE LA PROTEINE	AMORCE SENS 5' → 3'	AMORCE ANTI-SENS 5' → 3'	TAILLE ATTENDUE DE L'AMPLICON (pb)
SLC9A1	NHE1	TCTTCACCGTCTTTGTGCAG	AAGGTGGTCCAGGAACTGTG	125
SLC9A2	NHE2	GCCGACACAAGTGAGAGACA	AGTCGCTGCTATTGCCATCT	211
SLC9A4	NHE4	TGCATCTAACGCTTGGTTTG	GATGAGGAGGCAGCTTTCTG	193
SLC9A5	NHE5	GGGCTTAGTCTTTGCCTTCC	GATGTTGGCCTCCACGTACT	190
SLC9A6	NHE6	TCACCCTCACCATTCTCACA	CTTCACAGCTCAGGGTCACA	162
SLC9A7	NHE7	CCTGCGGATTTACAGGTGTT	AGCTCCGATGATGAAAATGG	215
SLC9A8	NHE8	ACACGCACCATAACCTCTCC	TGATCCCGGAAGAAATTCAG	229
SLC9A9	NHE9	CTGGCCATTTTCCATGAACT	GAAATTCCCCACAGACTGGA	177
ATP6V0C	Sous-unité V0c de la V-ATPase	CCAACTCCCTGAATGACGAC	AGGATCATGCCCACGAATAG	169
ATP6V1A	sous-unité V1A de la V-ATPase	ATGACAGGTTCTGCCCATTC	GAGGATGTCTCCCATGTGCT	152
SLC4A2	AE2	CCCAAATCTGCCCAAGATAA	CAAGTGCATCTCGGAAGTCA	160
SLC4A4	NBCe1	AGTCATCGTCCTTCCACCTG	GTTCGCTGCAATTCTTCACA	189
SLC4A7	NBCn1	GCAGCCCTTATTTGCATCAT	AGTTTCATTGCTGGGGTTTG	153
SLC4A5	NBCe2	GCCTGGATTGACAACATCCT	GGATACCGTTTTGGGGATCT	169
SLC4A8	NDCBE	AATGCCTGGAGTTCCAAATG	TGAGTGCATCTCGGTAGTCG	164
CTSB	Cathepsine B	ACAGCCCGACCTACAAACAG	CCAGTAGGGTGTGCCATTCT	239
CTSS	Cathepsine S	TCTCTCAGTGCCCAGAACCT	GCCACAGCTTCTTTCAGGAC	248
SCN5A	$Na_V1.5$	CACGCGTTCACTTTCCTTC	CATCAGCCAGCTTCTTCACA	208
18S rDNA	ARN 18S	CGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTT	TTCGCTCTGGTCCGTCTTG	121

c) PCR conventionnelle

La PCR conventionnelle (en point final) est effectuée à l'aide du kit illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, France) contenant les dNTP (200 µM pour chaque

dNTP), 2,5 unités d'ADN polymérase (puReTaq ADN polymérase), de l'albumine sérique bovine (BSA) et le tampon réactionnel. Le kit se présente sous forme de billes lyophilisées qui sont reconstituées dans un volume final de 25 µL, formant une solution contenant 10 mM de Tris, 50 mM de KCl et 1,5 mM de $MgCl_2$. Dans chaque tube réactionnel sont rajoutés 80 ng d'ADNc et 0,5 µM de chaque amorce (sens et anti-sens) dans un volume d'eau sans RNase ajusté à 25 µL afin de reconstituer les billes. Le protocole d'amplification par PCR du fragment d'ADNc d'intérêt dans un thermocycleur se compose de 35 cycles précédemment décrits.

Les fragments d'ADN qui ont été amplifiés par PCR peuvent être visualisés à la suite d'une séparation électrophorétique sur un gel d'agarose. L'électrophorèse s'effectue sur un gel contenant 2 % d'agarose (Réf. 16500-100 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) préparé dans un tampon Tris Acétate EDTA (TAE Réf. 15558-026 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France). Du bromure d'éthidium (Réf. H5041, Promega, France) à une concentration finale de 0,4 µg / mL est ajouté dans le gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence lorsqu'il est excité dans l'ultraviolet. Son intensité de fluorescence est plus importante lorsqu'il est intercalé, il permet donc de visualiser les fragments d'ADN amplifiés. Les produits de PCR sont préparés pour l'électrophorèse dans un tampon de dépôt et marqueur de migration « Blue/Orange Loading Dye, 6X" (Promega, France). Ce tampon permet de déposer les échantillons dans les puits mais aussi de suivre l'électrophorèse puisqu'il contient 3 colorants ayant des profils de migration connus : le xylène cyanol FF migre à environ 4 kb, le bleu de bromophénol à environ 300 pb et le orange G à 50 pb. Un marqueur de masse moléculaire « 50bp DNA Step Ladder » (Réf. G4521, Promega, France) est déposé dans un puits pour pouvoir vérifier si la taille des fragments de PCR est bien celle attendue. L'électrophorèse s'effectue en tampon TAE à voltage constant (80 V) pendant environ 30 minutes. Les fragments d'ADN peuvent ensuite être visualisés par exposition sous ultraviolet (GelDoc 2000, Biorad, France) puis analysés grâce au logiciel QuantityOne (V4.0.1, Biorad, France).

d) PCR en temps réel

(1) Principe

La PCR en temps réel permet de quantifier de façon relative ou absolue la quantité d'ADNc présente dans un échantillon. Le principe repose sur la possibilité de suivre en temps réel l'évolution de la PCR grâce à l'intégration d'une molécule fluorescente, le SYBR® Green, dans l'ADN double brin. Le SYBR® Green est une molécule qui interagit directement avec l'ADN double brin en émettant une fluorescence dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin produit par la réaction de PCR (longueur d'onde d'excitation 497 nm, d'émission 520 nm). Il est donc possible de quantifier l'ADN présent initialement dans le mélange réactionnel. Un thermocycleur équipé pour l'excitation et l'émission de fluorescence permet de mesurer en fin d'élongation de chaque cycle d'amplification l'intégration du SYBR® Green dans l'ADN double brin produit. La quantification s'effectue en tout début de phase exponentielle d'amplification en comparant le cycle pour lequel l'émission de fluorescence dépasse un seuil correspondant à la fluorescence du bruit de fond. Plus la quantité d'ADN présent au début de la réaction est grande (et donc la quantité d'ARN) plus le cycle pour lequel la phase exponentielle d'amplification commence (Ct) sera petit (Figure 20 courbes de l'échantillon A comparées à l'échantillon B).

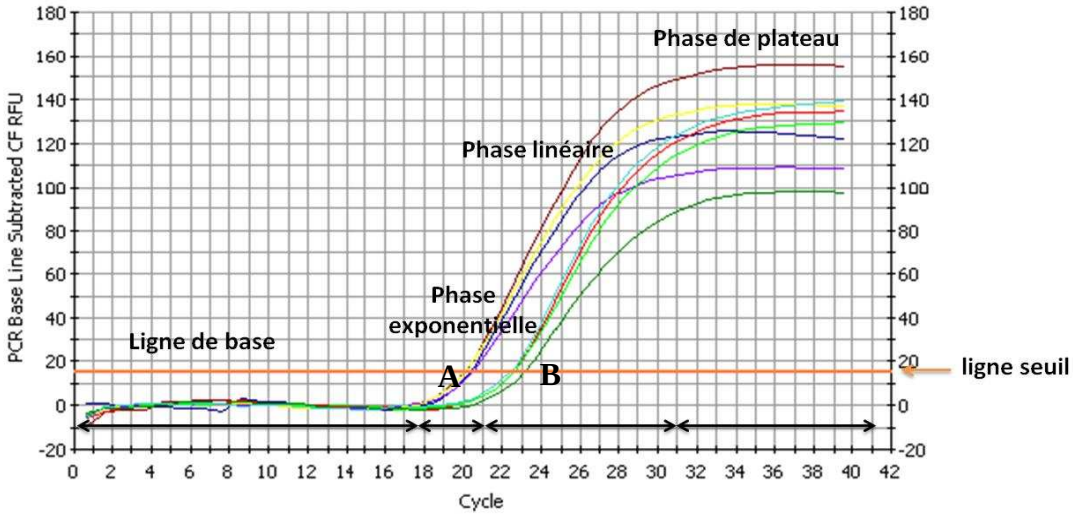


Figure 20 : Courbes d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel.

L'efficacité des amorces de PCR (E) peut être calculée grâce à l'amplification par PCR d'une gamme de dilutions connues d'ADNc. En théorie des dilutions au demi devraient donner des courbes décalées d'un cycle. Dans ce cas l'efficacité de la réaction est de 100 % et E sera de 2, la quantité d'ADN double à chaque cycle. Pour une efficacité de 100 % l'amplification exponentielle sera de 2^n où n est le nombre de cycles. Pour chaque paire d'amorces, il est

nécessaire de calculer l'efficacité de la réaction (E) grâce à la pente d'une courbe d'étalonnage (cycle seuil en fonction du logarithme de la concentration), où $E= 10^{-1/pente}$.
Une courbe de fusion est réalisée à la fin de la PCR et permet de vérifier la spécificité de l'amplification. Cette courbe est réalisée en mesurant la fluorescence émise lorsque la température passe de 72 à 91°C. La dérivée de cette courbe en fonction de la température donne une courbe dont l'abscisse du maximum du pic correspond à la température de fusion du produit de PCR. L'analyse des courbes de fusions permet de vérifier l'amplification d'un seul produit et l'absence de dimères d'amorces et de contamination par de l'ADN génomique.

(2) Méthode

Le kit utilisé (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, Réf. 11733-038, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) se présente sous forme d'une solution deux fois concentrée contenant l'ADN polymérase « Platinum® Taq DNA polymerase », le SYBR® Green I, du Tris-HCl, du KCl, 6 mM de $MgCl_2$, 400 µM de dGTP, 400 µM de dATP, 400 µM de dCTP, 800 µM de dUTP et de l'uracil DNA glycosylase (UDG). L'ADN polymérase contenue dans ce kit a été modifiée pour être inactive à température ambiante, son activité nécessite une activation lors de la première étape de dénaturation. La réaction s'effectue dans les puits d'une plaque 96 puits.

Pour chaque puits le mélange réactionnel contient 165 ng d'ADNc ou 0,165 ng pour l'ARN18S, 12,5 pmol de chaque amorce sens et anti-sens et 13 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, le volume final étant complété avec de l'eau à 25 µL. Chaque condition est répliquée quatre à six fois. La PCR quantitative est réalisée dans le iCycler™ system (BioRad, France) avec le protocole suivant : une étape de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes suivie de 35 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 10 secondes à 72°C. Les résultats sont calculés par la méthode des ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001). Cette méthode permet de déterminer l'effet d'un traitement (inhibiteur pharmacologique ou siRNA) sur l'expression d'un ARN messager spécifique. Pour chaque condition le ΔCt est déterminé comme la moyenne des Ct du gène étudié soustrait de la moyenne des Ct du gène de référence (ARN18S). Le ΔΔCt est calculé en soustrayant le ΔCt de la condition contrôle à celui de la condition étudiée. La variation du nombre de copie du gène cible est déterminée par la valeur $Q = (E)^{-\Delta\Delta Ct}$ où E correspond à l'efficacité des amorces. Q est de 1 lorsque la

quantité d'ARN n'est pas modifiée, supérieur à 1 dans le cas d'une surexpression et inférieur à 1 pour une sous-expression.

B. Analyse de l'expression des protéines par western blotting

Le western blot est une technique permettant la séparation électrophorétique des protéines d'un échantillon selon leur masse moléculaire et leur identification par immunomarquage. Cette technique est basée sur la capacité de migration des protéines chargées négativement par le dodécylsulfate de sodium (SDS) dans un gel d'acrylamide selon un champ électrique. Les protéines sont alors transférées du gel d'acrylamide vers une membrane permettant la fixation d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. L'identification des protéines se fait par la fixation d'anticorps puis par la détection du complexe antigène-anticorps.

1. Extraction et dosage des protéines cellulaires

a) Extraction des protéines

La solubilisation des protéines est réalisée à l'aide de différents tampons en fonction de la protéine d'intérêt (membranaire ou cytosolique) et de l'objectif de cette étude. Lors de l'analyse de l'expression d'une protéine, il est nécessaire de solubiliser cette protéine à l'aide d'un détergent et de détruire les liaisons qui peuvent exister avec d'autres protéines. Dans le cas d'études d'interactions entre protéines un compromis doit être trouvé entre une bonne solubilisation des protéines et la conservation des interactions protéines-protéines (p155 Co-Immunoprécipitation).

Les protéines totales sont extraites de préférence par grattage d'une boite de cellules en culture et non par trypsination afin d'éviter le clivage des protéines membranaires par la trypsine. Les cellules en culture sont placées sur de la glace afin d'éviter la dégradation des protéines cellulaires par les protéases cellulaires et leur dénaturation par la chaleur puis lavées deux fois avec du DPBS froid pour éliminer les protéines présentes dans le milieu de culture. Le tapis cellulaire est gratté dans un faible volume de tampon de lyse (70 µL pour 25 cm^2) à l'aide d'un grattoir. Deux principaux tampons ont été utilisés pour solubiliser les protéines cellulaires. L'un contient 5 % de SDS et est préparé dans du DPBS. Les protéines sont

solubilisées pendant 30 minutes à température ambiante puis le lysat obtenu est passé à travers une seringue de 1 mL et une aiguille fine (aiguille à insuline) afin de casser les filaments d'ADN visqueux et faciliter le dépôt. L'autre tampon utilisé contient 1 % de Triton X-100 (Sigma, France) préparé dans un tampon contenant 20 mM de Tris et 100 mM de NaCl. La solubilisation s'effectue sous agitation à 4°C pendant une heure. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 11 000 x g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Tous les tampons utilisés contiennent un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Réf. P2714 Sigma, France) contenant de l'AEBSF, de l'EDTA, de la bestatine, de l'E-64, de la leupeptine et de l'aprotinine et permettant d'inactiver les protéases libérées lors de la rupture des membranes cellulaires. Dans le cas d'études de protéines phosphorylées, des inhibiteurs de phosphatases sont ajoutés au tampon de lyse : 5 mM de fluorure de sodium, 20 mM de β-glycérophosphate, 0,2 mM d'orthovanadate de sodium et 1 mM de pyrophosphate de sodium décahydraté.

b) Dosage des protéines

Les comparaisons entre conditions seront effectuées à partir de dépôts d'une même quantité de protéines totales. La technique utilisée pour déterminer la concentration protéique d'un échantillon est le dosage par l'acide bicinchoninique (BCA) à l'aide du kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (Réf. 23225, Pierce, Thermo Fischer Scientific, France). Le principe de ce dosage est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{1+} en milieu alcalin par les liaisons peptidiques contenues dans les protéines. L'acide bicinchoninique est un réactif chromogénique du Cu^{1+} formant un complexe pourpre ayant un maximum d'absorbance à 562 nm. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration en protéines. La réaction s'effectue entre 25 µL d'échantillon préalablement dilué et 200 µL de réactif BCA dans une plaque 96 puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C avec le réactif BCA, l'absorbance des échantillons est mesurée à 562 nm avec un spectrophotomètre Spectra Max 190 (Molecular Devices, USA). La concentration d'un échantillon est déterminée par rapport à celles obtenues avec une gamme d'albumine sérique bovine (BSA) allant de 0 à 2 mg / mL.

Le dosage BCA pour déterminer la concentration en protéines d'une solution est une technique rapide et sensible (20 à 2000 µg / mL) avec l'avantage que les détergents contenus

dans les tampons de lyse interférent moins avec les mesures d'absorbance que la méthode de Bradford.

c) Préparation des échantillons

La séparation des protéines d'un échantillon dans un champ électrique selon leur masse moléculaire est effectuée après préparation des protéines dans un tampon contenant du SDS, permettant de dénaturer les protéines et de les charger négativement. Le SDS se fixant sur toutes les protéines de la même manière avec un rapport d'une molécule de SDS pour deux acides aminés, les protéines seront toutes chargées négativement. La charge propre à chaque protéine sera ainsi négligée. Les protéines migreront dans le gel d'acrylamide selon leur taille et donc leur masse moléculaire.

Le tampon de charge réducteur et dénaturant (dérivé du Laemmli) utilisé pour préparer les lysats cellulaires avant le dépôt sur gel d'acrylamide contient en concentration finale 10 % de glycérol, 5 % de β-mercaptoéthanol, 2,3 % de SDS, 0,125 M de Tris pH 6,8 et un colorant (le bleu de bromophénol). Il permet d'alourdir l'échantillon pour le déposer plus facilement, de dénaturer et de réduire les protéines et de suivre le front de migration à l'aide du colorant. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante avec ce tampon, les échantillons sont prêts à être déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide.

2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide et immuno-marquage

Le gel d'électrophorèse est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide et de bis acrylamide (Réf. H3574 Biorad, France). La polymérisation est initiée par la production de radicaux libres par le TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine) et le persulfate d'ammonium. Le gel d'électrophorèse se compose de deux parties, un gel de concentration et un gel de séparation. Le gel de concentration contenant 5 % d'acrylamide condense les protéines en une fine bande permettant une entrée simultanée des protéines dans le second gel. Le gel de migration permet la séparation des protéines selon leur masse apparente. La quantité d'acrylamide présente dans le gel de migration permettra de déterminer la résolution du gel. Une quantité d'acrylamide importante permettra de mieux séparer les petites protéines alors qu'une quantité plus faible permettra de mieux séparer de grosses protéines (qui migreront

plus facilement à travers le maillage). Un marqueur contenant des protéines de poids moléculaires connues et colorées permet de suivre l'électrophorèse et d'identifier la taille des protéines étudiées (Précision Plus Protein Standards Dual-Color Réf. 161-0374 Biorad, France). L'électrophorèse s'effectue à voltage constant à 90 mV lors de la concentration des échantillons puis à 130 mV pendant environ 1h30 lors de la séparation des protéines, dans un tampon Tris-glycine-SDS (Tableau VI).

Tableau VI : Composition du tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS pH 8,3

COMPOSE	CONCENTRATION
Tris	25 mM
glycine	190 mM
SDS	0,1 %

Les protéines ayant migré selon leur masse moléculaire sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) (immobilon-P Membrane, Millipore, France) afin de procéder à l'immunomarquage. Le transfert du gel vers la membrane de PVDF s'effectue à l'aide du système Mini Trans-Blot Cell (BioRad, France). Pour cela sont déposés de la cathode vers l'anode : une éponge, un papier Whatman, le gel, la membrane de PVDF préalablement activée pendant une minute dans du méthanol, un papier Whatman et une autre éponge. Le transfert d'effectue en milieu liquide dans un tampon Tris-glycine-méthanol (Tableau VII) qui aura également servi à humidifier les éponges et les papiers Whatman, pendant 100 minutes à 300 mA constants.

Tableau VII : Composition du tampon de transfert pH 8,3

COMPOSE	CONCENTRATION
Tris	25 mM
glycine	190 mM
méthanol	10 %

Après l'étape de transfert, les espaces de la membrane non occupés par des protéines sont saturés pendant 1 à 2 heures à température ambiante sous agitation dans une solution de TTBS (Tween Tris-Buffered-Saline) (Tableau VIII) contenant 5 % de lait écrémé. La membrane est

ensuite incubée pendant une nuit avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée à 4°C sous agitation (Tableau IX : Liste des anticorps primaires utilisés). Les membranes sont lavées 5 fois pendant 5 minutes avec du TTBS pour éliminer l'anticorps primaire en excès, puis incubées avec un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire (Tableau X) pendant 1h à température ambiante sous agitation. Enfin, les membranes sont de nouveau lavées 5 fois pendant 5 minutes avec du TTBS. La dilution des anticorps primaires et secondaire s'effectue dans la solution de TTBS contenant 5 % de lait écrémé. Dans le cas de l'anticorps anti-$Na_V1.5$ (Sigma, France), l'anticorps est préalablement dilué dans une solution de TTBS contenant 1 % de BSA pendant 30 minutes puis le volume est complété par une solution de TTBS contenant 5 % de lait écrémé.

Tableau VIII : Composition du TTBS pH 7,4

COMPOSE	CONCENTRATION
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 %

Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase du raifort qui permet la révélation de la protéine d'intérêt (HorseRadish, HRP) sauf dans le cas de l'anticorps anti-β-actine qui est directement couplé à la HRP. Le principe de la détection de la fixation des anticorps primaires et secondaires repose sur l'émission d'un photon par la réaction de la HRP avec son substrat. Cette révélation s'effectue à l'aide du kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific, France). La peroxydase du raifort, couplée à l'anticorps secondaire, permet l'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène présent dans les réactifs du kit ECL. La membrane est mise en présence des réactifs du kit pendant environ une minute puis est placée entre deux films plastiques. Un développement autoradiographique classique permet la détection du signal sur un film photographique (Kodak® BioMax™ light film, Sigma, France) après développement et fixation par les réactifs Kodak® processing chemicals for autoradiography films (Sigma, France). Le film est ensuite séché, scanné et analysé. Le signal peut également être capté à l'aide d'un imageur équipé d'une caméra CCD (MF-ChemiBis 3.2, DNR, FSVT, France). Dans les deux modes de révélation, le temps d'exposition de la membrane sur le film ou sur la caméra doit être contrôlé afin d'obtenir un

signal clair et non surexposé. Les images sont analysées à l'aide du logiciel MultiGauge V3.0 (Fujifilm, FSVT, France).

Tableau IX : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blotting

Anticorps Primaires

PROTEINE RECHERCHEE	ANTICORPS	REFERENCE	FOURNISSEUR	DILUTION	ESPECE REACTIVE	MASSE MOLECULAIRE
NHE1	IgG1 monoclonales anti-NHE1 clone 4E9	MAB3140	Chemicon International, Millipore France	1/1000	souris	90-110kDa
Canaux sodiques Na_V	IgG1 Monoclonales anti-sodium channel (pan) clone K58/35	S8809	Sigma, France	1/200	souris	250kDa
$Na_V1.5$	IgG anti-$Na_V1.5$	S0819 lot 061M1688	Sigma, France	1/1000	lapin	250kDa
$Na_V1.5$	IgG anti-$Na_V1.5$		Xu *et al*., 2005	1/200	lapin	250kDa
β-Actine	IgG1 monoclonales anti-β-actine HRP	(C4) sc-47778	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	souris	43kda
HSC70	IgG2a monoclonales anti-HSC70	(B-6) sc-7298	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/30000	souris	70kDa
Ezrin	IgG1 monoclonales anti-Ezrin	(3C12) sc-58758	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	souris	87kda
p-Ezrin (thr 566)	IgG anti-p-Ezrin	sc-101677	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	lapin	87kda
Cortactine	IgG1 monoclonales anti-cortactine (p80/85) clone 4F11	05-180	Millipore, France	1/1000	souris	80 kDa
Cathepsine B	IgG anti-cathepsine B	20-CR71	Fitzgerald, USA	1/1000	lapin	20, 25 et 37kDa
14-3-3	IgG anti-14-3-3 (pan)	(K19) sc-629	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	lapin	32kDa
p44/42 MAPK (Erk1/2)	IgG1 monoclonales anti-p44/42 MAPK	4696	Cell signaling, Ozyme France	1/3000	souris	42-44 kDa
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	IgG anti-Phospho-p44/42 MAPK	9101	Cell signaling, Ozyme France	1/1000	lapin	42-44 kDa
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10)	IgG1 monoclonales anti-Phospho-p38 MAPK	9216	Cell signaling, Ozyme France	1/1000	souris	43kDa
MT1-MMP	IgG anti-MT1-MMP	AB6004	Millipore, France	1/1000	lapin	65kDa
FAK	IgG anti-FAK	(C20) sc-558	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/1000	lapin	125kDa
B-adaptine	IgG1 monoclonales anti-β-adaptine	BD610382	BD Biosciences, France	1/2500	souris	109kDa
cavéoline-1	IgG monoclonales anti-cavéoline-1	3267	Cell signaling, Ozyme France	1/2000	lapin	22kDa
Phospho-cortactine (Y421)	IgG anti-Phospho-cortactine	AB3852	Chemicon International, Millipore France	1/1000	lapin	80kDa

Tableau X : Liste des anticorps secondaires utilisés pour le western blotting

Anticorps Secondaires					
	ANTICORPS	REFERENCE	FOURNISSEUR	DILUTION	ESPECE
anti-lapin	anti-lapin IgG-HRP	sc-2004	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/3000	chèvre
anti-souris	anti-souris IgG-HRP	sc-2005	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/3000	chèvre

C. Co-Immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation permet d'étudier des interactions entre deux protéines. Pour cela, une protéine est précipitée par un anticorps spécifique dans un tampon de lyse permettant d'extraire les protéines tout en conservant les interactions qui peuvent exister. Des billes couplées à une protéine recombinante contenant les domaines de fixation des protéines A et G aux immunoglobulines permet de séparer du lysat le complexe anticorps-antigène ainsi que les protéines qui étaient associées à l'antigène. Après plusieurs lavages du complexe billes-anticorps-antigène, les protéines fixées à l'anticorps sont dénaturées puis analysées par western blotting.

Les cellules cultivées dans une boite de 25 cm² sont lavées 3 fois dans du DPBS froid puis grattées dans 1 mL de tampon de lyse (Tris 50 mM pH=7, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Glycérol 10 %, Triton X-100 1 %, inhibiteurs de protéases). Après dosage des protéines, le lysat (500 µg dans 500 µL) est incubé pendant 30 minutes avec 20 µL de billes magnétiques Bio-Adembeads PAG (Réf. 0463, Ademtech, France) préalablement lavées dans du tampon de lyse. Cette première incubation des billes avec le lysat protéique permet d'éliminer certaines protéines qui se fixent de manière non spécifique sur les billes magnétiques. Les billes sont séparées du lysat grâce à un portoir magnétique puis le lysat est incubé pendant une nuit sous agitation à 4°C avec 1 µg d'anticorps anti-NHE1 (4E9, Chemicon, Thermo Fischer Scientific, France) ou 1µg d'immunoglobulines de souris (IgG de souris, Abcys France) afin de s'assurer de la spécificité de l'interaction avec l'anticorps utilisé. Les billes magnétiques (20 µL) préalablement lavées dans du tampon de lyse sont ajoutées au lysat pendant 2h30 à température ambiante sous agitation. La fixation non spécifique de protéines sur l'anticorps est éliminée par 5 lavages dans 500 µL de tampon de lyse. Les protéines fixées aux billes magnétiques sont éluées dans 20 µL de tampon de charge utilisé pour le western blotting puis chauffées à 95°C pendant 5 minutes et déposées sur un

gel d'acrylamide (10µL par condition). Le premier surnageant avant les lavages du complexe anticorps-antigène-billes est conservé et sera également déposé pour s'assurer de la disparition de la protéine immunoprécipitée du lysat. Le western blot sera révélé avec un anticorps anti-NHE1 pour s'assurer de l'immunoprécipitation de cette protéine puis avec des anticorps anti-$Na_V1.5$, cortactine et cavéoline-1 pour étudier leur interaction avec NHE1.

D. Transfection transitoire par des ARN interférents

Le phénomène d'ARN interférence permet d'inhiber spécifiquement l'expression d'un ARNm à partir d'ARN double brin. Les « Small Interfering RNA » (siRNA) sont de courtes séquences d'ARN double brin (20-25 nucléotides) ciblant spécifiquement un ARN messager. Une fois introduit dans la cellule, le siRNA est pris en charge par un complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Le brin non complémentaire à l'ARNm est dégradé tandis que le brin complémentaire guide le complexe vers son ARNm cible. La protéine Argonaute, une endonucléase du complexe RISC, clive l'ARNm qui sera dégradé par des exonucléases cellulaires.

Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées par un ensemble de trois siRNA dirigés contre les ARNm de NHE1 (sc-42650, Santa Cruz, Tebu-Bio, France) ou de $Na_V1.5$ (sc-42640, Santa Cruz, Tebu-Bio, France). Un siRNA ne ciblant aucun gène connu (sc-37007, Santa Cruz, Tebu-Bio, France) est utilisé comme contrôle. Un agent transfectant, la lipofectamine RNAimax (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) neutralise les charges des siRNA pour leur permettre de traverser la membrane cellulaire et d'être libérés dans le milieu intracellulaire. Pour cela, une solution contenant les siRNA, à une concentration finale de 10 nM pour le siNHE1 ou 20 nM pour le si$Na_V1.5$ et la lipofectamine (0,23 % du volume final) est préparée dans du milieu DMEM sans SVF. Après 20 minutes d'incubation permettant aux complexes lipofectamine-siRNA de se former, les cellules en suspension sont ajoutées au mélange puis ensemencées. L'efficacité de l'inhibition d'expression du gène cible est vérifiée par PCR en temps réel et / ou par western blotting. Les cellules sont récoltées 24h après la transfection pour être utilisées lors des différentes expériences (migration, invasion, pH, patch clamp…). Ce temps de 48h après la transfection permet d'obtenir la meilleure efficacité des siRNA dirigés contre $Na_V1.5$. Une cinétique a été réalisée pour déterminer le temps nécessaire pour avoir une efficacité optimale du siNHE1 (Figure 29).

III. Etude des propriétés des cellules cancéreuses

A. Etude de la prolifération ou de la toxicité cellulaire

1. Test de viabilité cellulaire : MTT

La viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT (bromure de 2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazolium) (Mosmann, 1983). Ce test colorimétrique est basé sur la réduction des sels de tétrazolium jaunes en cristaux de formazan violets insolubles en solution aqueuse. La réduction du MTT s'effectue par les oxydoréductases et déshydrogénases (dépendantes du NADH) cytosoliques et majoritairement mitochondriales des cellules métaboliquement actives, ce qui permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes. La mesure par spectrophotométrie de l'absorbance à 570 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 40 000 à 80 000 cellules par puits en présence ou non de la substance à tester. Après 24h de culture pour les tests de cytotoxicité ou 4 jours pour les tests de prolifération, les cellules MDA-MB-231 sont incubées pendant 1 heure à 37°C avec 400 µL d'une solution de MTT à 0,5 mg / mL préparée dans du milieu de culture. Puis, les cristaux de formazan sont dissous dans 400 µL de DMSO. Pour chaque puits, 200 µL sont transférés sur une plaque 96 puits afin de mesurer l'absorbance à 570 nm à l'aide du spectrophotomètre Spectra Max 190 (Molecular Devices, USA). L'absorbance du DMSO seul est soustraite de chaque valeur. La prolifération ou la cytotoxicité sont exprimées en pourcentage de cellules vivantes par rapport au contrôle.

Ce test permet de mesurer la viabilité cellulaire de manière précise et reproductible pour identifier si une substance est toxique ou si elle modifie les propriétés de prolifération des cellules cancéreuses. Néanmoins, le test MTT étant basé sur l'activité mitochondriale, il est nécessaire d'utiliser une autre technique pour vérifier que le composé étudié n'agit pas sur l'activité mitochondriale. Le test MTT a été préféré au test au bleu de Trypan pour sa plus grande facilité d'utilisation.

2. Coloration des cellules au bleu de méthylène

Le test au bleu de méthylène est utilisé pour confirmer les résultats obtenus par le test MTT et s'affranchir d'un effet de la condition à tester sur l'activité mitochondriale. Le bleu de méthylène est utilisé pour colorer les cellules adhérentes au support. La coloration peut ensuite être dissoute dans de l'acide chlorhydrique et l'absorbance à 630 nm mesurée avec un spectrophotomètre. L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le puits. Le bleu de méthylène se fixe aussi bien sur les cellules vivantes que sur les cellules mortes, un lavage avant l'incubation avec le bleu de méthylène permet de retirer les cellules décollées et de ne conserver que les cellules adhérentes. Ce test qui permet de mesurer le nombre de cellules est donc complémentaire du test MTT bien que moins sensible.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à la même densité cellulaire que pour le test MTT en présence ou non de la substance à tester. Après 24h pour la cytotoxicité ou 4 jours pour la prolifération, les puits sont lavés avec du DPBS puis les cellules sont fixées avec du méthanol. Les cellules sont colorées pendant 10 minutes avec du bleu de méthylène 1 %. La plaque est ensuite lavée par immersion puis séchée. Le colorant est dissout dans 300 µL d'acide chlorhydrique 0,1 N sous agitation à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 630 nm avec le spectrophotomètre Spectra Max 190 (Molecular Devices, USA). L'absorbance de l'acide chlorhydrique seul est soustraite de chaque valeur. La prolifération ou la cytotoxicité sont exprimées en pourcentage de cellules vivantes par rapport au contrôle.

B. Etude de la mort cellulaire par apoptose

La Méthode d'O. Frankfurt (Frankfurt *et al.*, 1996) permet la détection des cellules apoptotiques par immuno-marquage puis cytométrie en flux. Elle est basée sur la sensibilité de l'ADN des cellules en apoptose à la dénaturation par la chaleur en présence de formamide. L'anticorps monoclonal F7-26 (AbC156 IgM anti ss DNA/APOSTAIN AbCys, France) se fixe spécifiquement sur l'ADN simple brin. Un chauffage en présence de formamide dénature seulement l'ADN des cellules apoptotiques ce qui permet de distinguer la nécrose de l'apoptose.

Après obtention de la suspension cellulaire par trypsination puis lavages dans du DPBS, les cellules (de 125 000 à 250 000 cellules dans 250 µL de DPBS) sont fixées par du méthanol

glacé. Après centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans 250 µL de formamide puis chauffé à 75°C pendant 10 minutes. La suspension cellulaire est remise à température ambiante pendant 15 minutes, puis saturée pendant 15 minutes dans une solution de DPBS contenant 1 % de lait écrémé. La solution de saturation est retirée par centrifugation à 700 x g pendant 5 minutes puis les cellules sont incubées pendant 15 minutes avec 10 µg / mL d'anticorps F7-26 dilué dans du DPBS contenant 5 % de SVF. Après un lavage par un ajout de DPBS puis une centrifugation à 700 x g pendant 5 minutes, 20 µg / mL d'anticorps secondaire anti-IgM couplé au FITC (F9259 Sigma, France) préparé dans du DPBS contenant 1 % de lait écrémé sont incubés pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées dans du DPBS puis analysées par un cytomètre en flux Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, France) équipé d'un laser Argon 488. Un contrôle isotypique est utilisé afin de s'affranchir d'une éventuelle fixation non spécifique de l'anticorps F7-26. Pour cela, une partie de la suspension cellulaire est incubée avec l'anticorps F7-26 et l'autre avec un IgM (M5909, Sigma France) (10 µg / mL dans du DPBS contenant 5 % de SVF). Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Expo32 (Beckman Coulter, France).

C. Etude de la polymérisation de l'actine

La polymérisation de l'actine est évaluée par la fixation de phalloïdine, toxine se fixant sur l'actine polymérisée (F-actine), couplée à un AlexaFluor594® (A12381 Alexa Fluor® 594 phalloïdin, Molecular probes, Thermo Fischer Scientific, France) (Favia *et al.*, 2009). Le fluorophore peut être dissous puis la fluorescence mesurée permettra d'évaluer les variations de quantité d'actine polymérisée.

Après 24h de culture dans des puits de plaques 6 puits, les cellules sont lavées avec du DPBS puis fixées avec une solution contenant 4 % de formaldéhyde (formaldéhyde 30 % stabilisé dans 10 % de méthanol, Carlo Erba, France) et 4 % de saccharose dans 0,1 % de DPBS froid pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont perméabilisées avec une solution de DPBS contenant 0,1 % de Triton X-100 pendant 3 minutes puis sont incubées pendant 1h avec la phalloïdine594® diluée au 200ème dans du DPBS. Après deux lavages dans du DPBS, la phalloïdine594® fixée à la F-actine est extraite dans du méthanol pendant une nuit à 4°C sous agitation. La fluorescence dans le surnageant émise à 609 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 585 nm est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi

F-2500 (Hitachi, Japon). Un traitement des cellules avant la fixation, pendant 30 minutes à 37°C avec 0,5 µM de cytochalasine D (Thermo Fischer Scientific, France), bloquant la polymérisation de l'actine, est utilisé afin de s'assurer de la diminution de la polymérisation de l'actine par cette toxine. Après mesure de la fluorescence dans les surnageants, les cellules sont grattées dans un tampon de lyse contenant 5 % de SDS et des inhibiteurs de protéases préparé dans du DPBS puis la quantité de protéine dans chaque condition est mesurée à l'aide d'un dosage BCA. Les valeurs de fluorescence sont normalisées par rapport à la quantité de protéine et au contrôle.

D. Etude de la migration et de l'invasivité cellulaire *in vitro*

Les cellules cancéreuses sont capables de dégrader leur environnement extracellulaire et de migrer à travers les tissus pour passer dans la circulation et envahir des tissus hôtes. Il est possible de modéliser ces phénomènes *in vitro* en évaluant la migration et l'invasivité cellulaire. Nous avons défini le terme de migration comme étant la capacité des cellules à franchir de manière active un filtre de polyéthylène téréphtalate contenant des pores de 8 µm de diamètre (Réf. 353097, BD Biosciences, France). Dans le cas de l'évaluation de l'invasivité cellulaire, ces mêmes filtres sont recouverts d'un film de Matrigel™, mimant ainsi la matrice extracellulaire (Réf. 354480, BD Biosciences, France). Dans ces conditions, les cellules doivent dégrader le Matrigel™ avant de migrer à travers les pores du filtre. L'objectif de ces techniques est de compter le nombre de cellules ayant migré à travers les pores et présentes sur la surface inférieure de l'insert (Figure 21). La taille des cellules étant supérieure au diamètre des pores, le phénomène présenté ici correspond bien à une migration active des cellules qui doivent se déformer pour traverser ces pores et non à un effet de la gravité. Les cellules utilisées dans le cadre de cette étude étant par ailleurs des cellules adhérentes. Les tests de migration et d'invasivité constituent un moyen simple et précis d'évaluer le comportement des cellules cancéreuses *in vitro*. Il est cependant nécessaire d'ensemencer parfaitement le même nombre de cellules pour chaque insert et de contrôler le temps de migration ainsi que la répartition homogène des cellules au risque de fausser les résultats. Il est également nécessaire de s'assurer que la substance à tester n'a pas d'effet toxique sur les cellules.

Les inserts contenant les filtres sont placés dans une plaque 24 puits et permettent de délimiter un compartiment supérieur et inférieur. La suspension cellulaire contenant 60 000 cellules

MDA-MB-231 dans 200 µL de milieu DMEM contenant 5 % SVF est déposée dans le compartiment supérieur de l'insert avec la substance à tester. Le compartiment inférieur est rempli avec 800 µL de DMEM supplémenté par 10 % de SVF avec également la substance à tester. La différence de SVF entre les compartiments supérieurs et inférieurs permet l'établissement d'un gradient chimioattractant (d'hormones et de facteur de croissance). Après 24h de migration ou d'invasion, les inserts sont lavés au DPBS puis les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans du méthanol glacé et colorées à l'hématoxyline. Les cellules situées sur la face supérieure de l'insert sont retirées pour ne compter que les cellules ayant migré à travers les pores.

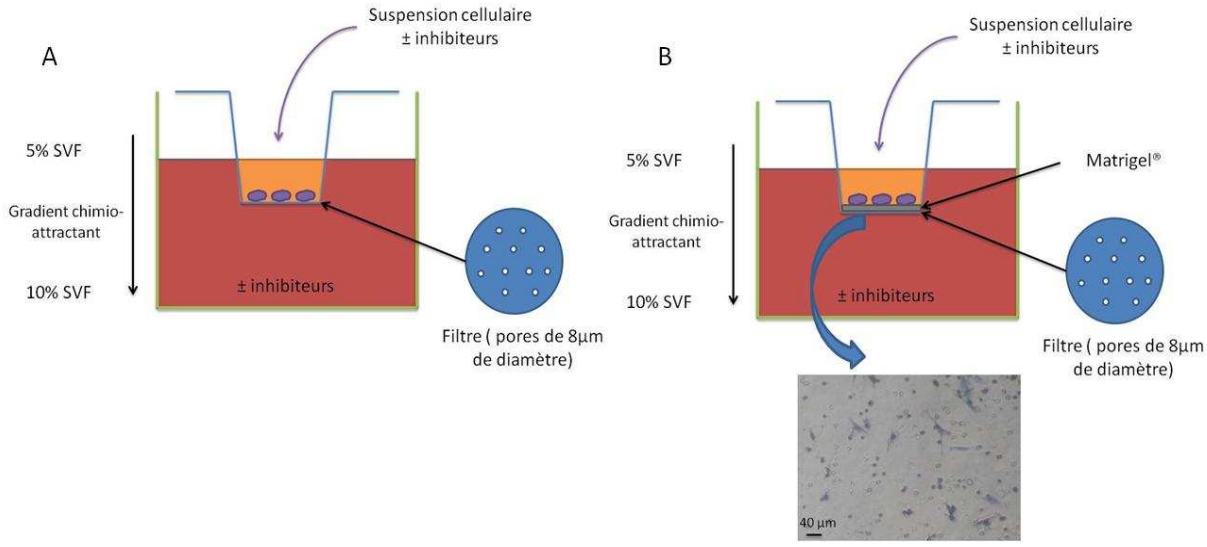


Figure 21 : Inserts utilisés lors des tests de migration (A) et d'invasivité (B) cellulaire.

Le comptage d'effectue sur des photos de chaque insert à l'aide du logiciel MesurimPro V3.2 (logiciel gratuit développé par J-F Madre, Amiens). Pour chaque insert 5 photos à un grossissement de 200 fois sont faites de manière à représenter tout l'insert. Pour les tests d'invasivité cellulaire, le nombre de cellule étant plus faible, tout l'insert sera compté afin d'être plus précis et d'éviter les biais de sélection des champs à prendre en photo. Le nombre de cellules ayant migré est normalisé par insert par rapport à la moyenne du contrôle de l'expérience.

E. Etude de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire

La technique des inserts d'invasion étant basé sur la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules mais aussi sur leur capacité à traverser le filtre poreux, il est possible d'isoler chacun de ces deux paramètres et de mesurer seulement la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire sans que la migration n'entre en compte. Cette technique de mesure de dégradation protéolytique est basée sur des substrats fluorogéniques de protéases placés dans une matrice (ici du Matrigel™). Le substrat utilisé est de la DQ-gelatin™ (D-12054 Molecular probes, Thermo Fischer Scientific, France). Ce substrat est couplé à de la fluorescéine et est non fluorescent lorsqu'il n'est pas dégradé. Le clivage de la DQ-gelatin™ par une gélatinase ou une collagénase induit une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la quantité de dégradation. Le Matrigel™ se gélifiant à température ambiante, les plaques, pipette et cônes utilisés doivent être au préalable refroidis et conservés à -20°C. Après décongélation à 4°C, le Matrigel™ est dilué au tiers dans du DMEM sans SVF puis complété avec 25 µg / µL de DQ-gelatin™. Une couche uniforme de Matrigel™ est déposée sur les puits de lames compartimentées Lab-tek™ (60 µL par cm²). La lame est placée à 37°C pendant 30 minutes pour permettre au Matrigel™ de commencer à se solidifier. Les cellules sont ensemencées pour obtenir des cellules isolées permettant leur observation (5 000 cellules par cm²). La couche de Matrigel™ étant épaisse, les cellules se développeront dans l'épaisseur de la matrice. Après 24h de culture (pour éviter la formation de colonies), la préparation cellulaire est lavée dans du DPBS puis fixée avec une solution contenant 4 % de formaldéhyde et 4 % de saccharose dans 0,1 % de DPBS froid pendant 20 minutes à température ambiante. Après 3 lavages dans du DPBS, les puits sont retirés et la lame est montée avec du milieu de montage SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (Réf. S36939 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) et une lamelle couvre-objet. La dégradation de la DQ-gelatin™ est visualisée à l'aide du microscope d'épifluorescence Eclipse Ti-S (Nikon France) équipé d'une lampe à vapeur de mercure (C-SHG1, Nikon, France) et d'une caméra (Digital camera DXM 1200F, Nikon, France). Les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation de la fluorescéine sont sélectionnées à l'aide du cube GFP-3035B (Semrock, USA). L'acquisition s'effectue à un grossissement de 400 x à l'aide du logiciel NIS-Eléments V3.0 (Nikon, France). Les images sont analysées et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ 1.45s (National Institue of Health, USA).

IV. Mesures du pH intracellulaire et périmembranaire et de l'activité de l'échangeur sodium-proton

A. Mesure du pH intracellulaire et périmembranaire par spectrofluorimétrie

1. Mesure du pH intracellulaire

a) Principe

Le pH intracellulaire (pH_i) est mesuré à l'aide d'une sonde fluorescente, le 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF), dérivée de la fluorescéine (Réf. B1170 Thermo Fischer Scientific, France). Ce fluorophore est utilisé sous forme d'un mélange de trois isoformes estérifiées par des groupements acétoxyméthyl (BCECF-AM) (Rink *et al*., 1982) ce qui le rend non fluorescent et non chargé et lui permet de traverser les membranes cellulaires (Figure 22). A l'intérieur des cellules, les groupements acétoxyméthyl ester sont hydrolysés par des estérases non spécifiques, induisant la fluorescence et la rétention du fluorophore, peu diffusible, à l'intérieur de la cellule. Le BCECF possède en effet 4 à 5 charges négatives à pH=7. Le BCECF présente un pic d'émission à 530 nm et deux longueurs d'ondes d'excitation sont utilisées : l'une à 444 nm, point isobestique indépendant du pH_i, et l'autre à 503 nm dépendante du pH_i (Figure 22). En milieu acide, les protons neutralisent les groupements carboxyliques induisant une diminution de la fluorescence, alors qu'en milieu alcalin, les groupements du BCECF sont ionisés, la fluorescence augmente. Pour éviter des erreurs de mesure dues à la perte de la sonde, au photo-blanchiment, à une répartition non uniforme de la sonde ou des erreurs d'interprétations en fonction de la charge en fluorophore ou du nombre de cellules, le pH_i est calculé comme le rapport des intensités de fluorescence à 530 nm pour des excitations de 503 et 444 nm.

Cette technique de mesure de pH intracellulaire par fluorimétrie et ratiométrie est une technique sensible et reproductible permettant d'apprécier l'effet de différents agents pharmacologiques ou moléculaires sur la régulation du pH intracellulaire des cellules. Elle présente l'avantage de mesurer le pH intracellulaire d'une population cellulaire en suspension

dans une cuve ce qui est intéressant dans le cas d'un traitement par un siRNA qui n'a pas une efficacité de 100 %. L'inconvénient majeur de cette technique est l'utilisation de cellules en suspension, ce qui ne représente pas au mieux la physiologie de cellules adhérentes. Cette technique ne permet pas d'obtenir des informations sur le pH intracellulaire à l'échelle d'une cellule unique. Pour cela il faudrait utiliser un système de microspectrofluorimétrie.

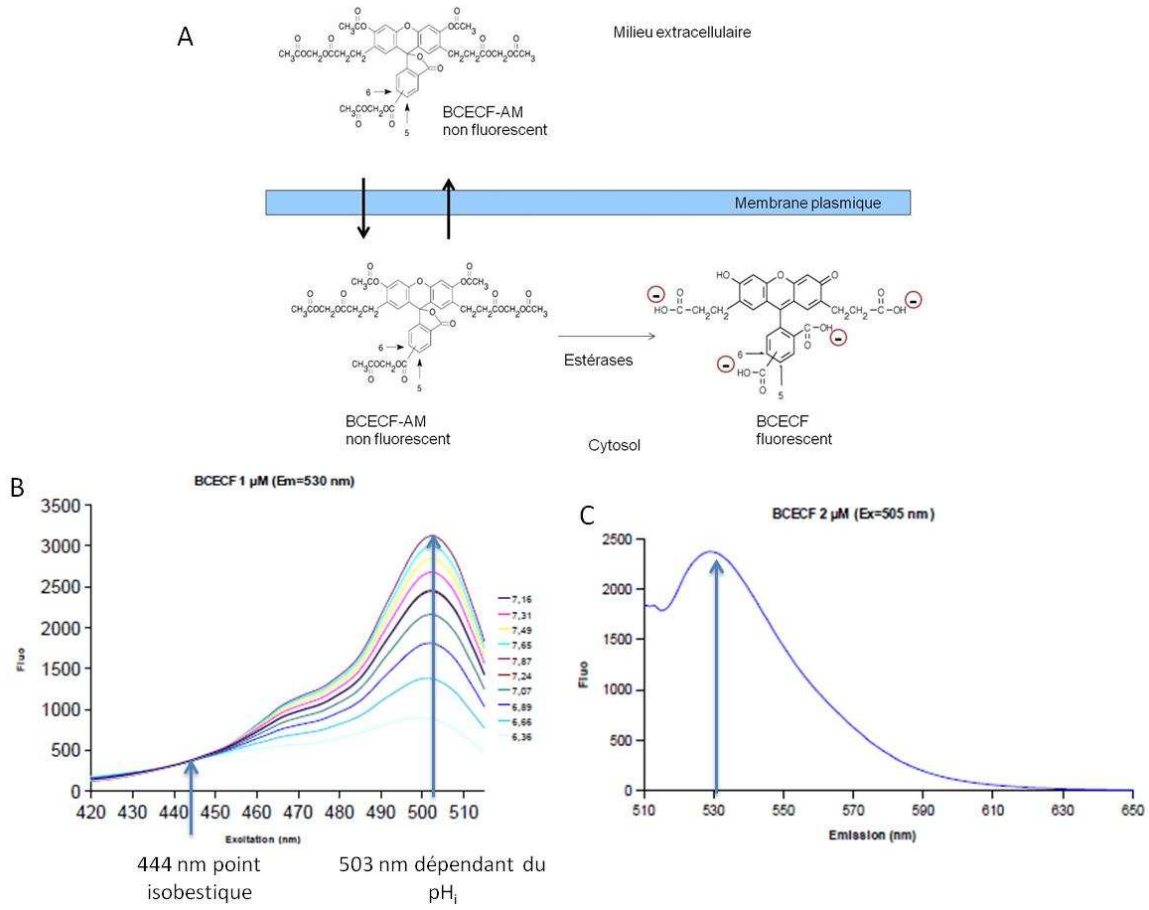


Figure 22 : Principe des mesures de pH intracellulaire avec le BCECF.

A. Le BCECF est estérifié par des groupements acétoxyméthyl qui lui permettent de traverser les membranes cellulaires. Des estérases intracellulaires clivent les groupements acétoxyméthyl permettant la rétention du BCECF fluorescent dans les cellules. Modifié d'après Molecular Probes®, Invitrogen B. Spectre d'excitation du BCECF pour une longueur d'onde d'émission de 530 nm. C. Spectre d'émission du BCECF pour une longueur d'onde d'excitation de 505 nm.

b) Isolement des cellules et solutions utilisées

Les cellules (100 000 cellules / cm²) sont lavées deux fois avec une solution physiologique de Hanks (Réf. H1387, Sigma, France), puis elles sont incubées avec du Hanks sans calcium ni magnésium contenant 2 mM d'EDTA (Tableau XI) (Réf. H4891, Sigma, France) pendant 5

minutes sous agitation circulaire à température ambiante. Cette incubation ainsi qu'un grattage doux avec un râteau permet de décoller les cellules et de les mettre en suspension sans avoir à les trypsiner, ce qui pourrait être délétère pour l'activité de nombreuses protéines membranaires. Les cellules recueillies sont centrifugés à 1000 x g pendant 5 minutes. Le culot contenant les cellules est remis en suspension dans une solution de Hanks contenant du calcium et du magnésium puis de nouveau centrifugé afin d'éliminer toute trace d'EDTA. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 10 mL de Hanks puis incubé pendant 30 minutes à 37°C avec le BCECF-AM (dilué dans du DMSO) à une concentration finale de 2 µM. Après l'incubation, l'excès de fluorophore est retiré par un lavage des cellules dans du Hanks et une centrifugation à 1000 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du Hanks afin d'obtenir une suspension de 1 à 2 millions de cellules par mL. Pour chaque mesure, 1 mL de suspension cellulaire est centrifugé 5 minutes à 1000 x g pour retirer le fluorophore qui aurait pu être expulsé des cellules, puis le culot est remis en suspension dans 2 mL de milieu approprié dans une cuve de mesure en quartz. La mesure s'effectue à une température de 37°C sous agitation grâce à un spectrofluorimètre Hitachi F-2500 équipé d'une lampe xénon et d'un monochromateur (Hitachi, Japon). Le spectrophotomètre mesure à 530 nm un point de fluorescence toutes les deux secondes pendant 20 minutes alternativement pour les longueurs d'ondes d'excitation de 444 nm et 503 nm.

Le pH intracellulaire étant mesuré à l'aide de cellules en suspension et sous agitation, afin de ne pas les laisser trop longtemps en suspension, les cellules sont utilisées dans les deux heures après les avoir décollées. Les volumes de solutions à ajouter dans la cuve ont été minimisés pour ne pas trop faire varier le volume de la suspension cellulaire. Les solutions utilisées ne contiennent pas de bicarbonates pour s'affranchir de l'implication des transporteurs de bicarbonate et ont été tamponnées à l'aide d'HEPES à un pH de 7,4.

Trois types de paramètres peuvent être étudiés grâce à ces mesures de pH intracellulaire : le pH intracellulaire à l'équilibre, le pouvoir tampon ou l'activité d'efflux de protons dépendant du sodium de cellules acidifiées.

Tableau XI : Composition des solutions utilisées pour les mesures de pH intracellulaire.

Le pH des solutions de Hanks et de Hanks sans Ca^{2+}, Mg^{2+} est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH, celui de la solution sans Na^+ avec du KOH.

COMPOSITION EN mM	HANKS	HANKS SANS Ca^{2+}, Mg^{2+}	SOLUTION SANS Na^+
$CaCl_2$	1,26	-	1.26
$MgSO_4$	0,8	-	0.8
KCl	5,36	5,36	5,36
KH_2PO_4	0,44	0,44	0,44
NaCl	137	137	-
Na_2HPO_4	0,337	0,337	0,337
D-Glucose	5,55	5,55	5,55
Hepes	20	20	20
EDTA	-	2	-
n-méthyl-D-glucamine (NMDG)	-	-	137

c) Mesure du pH intracellulaire à l'équilibre et du pouvoir tampon

La mesure du pH intracellulaire à l'équilibre permet de comparer l'influence d'un traitement par un inhibiteur pharmacologique ou par un siRNA sur le pH_i des cellules à l'équilibre dans un milieu physiologique classique de Hanks (sans modifier artificiellement leur pH_i). Le pH_i à l'équilibre est calculé à partir de la pente des 180 premières secondes de la mesure. Le pouvoir tampon est également calculé à partir de cellules à l'équilibre dans du Hanks. Le pouvoir tampon intracellulaire (β_i) (exprimé en mM H^+ / UpH) est déterminé comme le changement de pH_i induit par l'ajout de 20 mM de NH_4Cl (Roos and Boron, 1981). Il se calcule à l'aide de la formule suivante : $\beta_i = \Delta[NH_4^+]_i / \Delta pH_i$

où : $[NH_4^+]_i = [NH_3]_i \times 10^{pKa-pHi}$

et $[NH_3]_i = [NH_4^+]_e \times 10^{pHe-pKa}$

pKa = 9.21

i et e correspondent respectivement à intracellulaire et extracellulaire

Le pouvoir tampon intracellulaire correspond à la capacité des cellules à tamponner une entrée d'espèces acides ou basiques, c'est-à-dire à minimiser le changement de pH dû à ces entrées. Une base faible, le NH_4Cl a été utilisée pour mesurer le pouvoir tampon des différentes populations cellulaires. Le NH_4Cl ajouté à une concentration finale de 20 mM dans le milieu extracellulaire se dissocie en $NH_4^+ + Cl^-$ puis $NH_3 + H^+$. Le NH_3 (non chargé) entre dans les cellules et fixe les protons intracellulaires ce qui conduit à une rapide alcalinisation, suivie d'une acidification plus lente due à l'entrée des ions NH_4^+ (Figure 23). Cette mesure permet de normaliser les différents lots de cellules et d'exprimer les variations de pH observées en concentration de protons puisque $\Delta[H^+]_i = \Delta[pH]_i \times \beta_i$.

A la fin de chaque cinétique, une calibration est effectuée permettant de convertir les valeurs de fluorescence obtenues (ratio 503 / 444 nm) en valeur de pH. Pour cela, les pH intracellulaire et extracellulaire sont équilibrés à l'aide d'un détergent qui perméabilise les membranes : la digitonine, utilisée à une concentration de 70 µM. L'étalonnage s'effectue par trois à quatre ajouts d'acide chlorhydrique 0,1 N (ou de NaOH 0,1 N) et la mesure simultanée du pH dans la cuve à l'aide d'une électrode de pH. Ainsi à chaque pH ($pH_i = pH_e$ après action de la digitonine) est associée une valeur du rapport de fluorescence 503 / 444 nm.

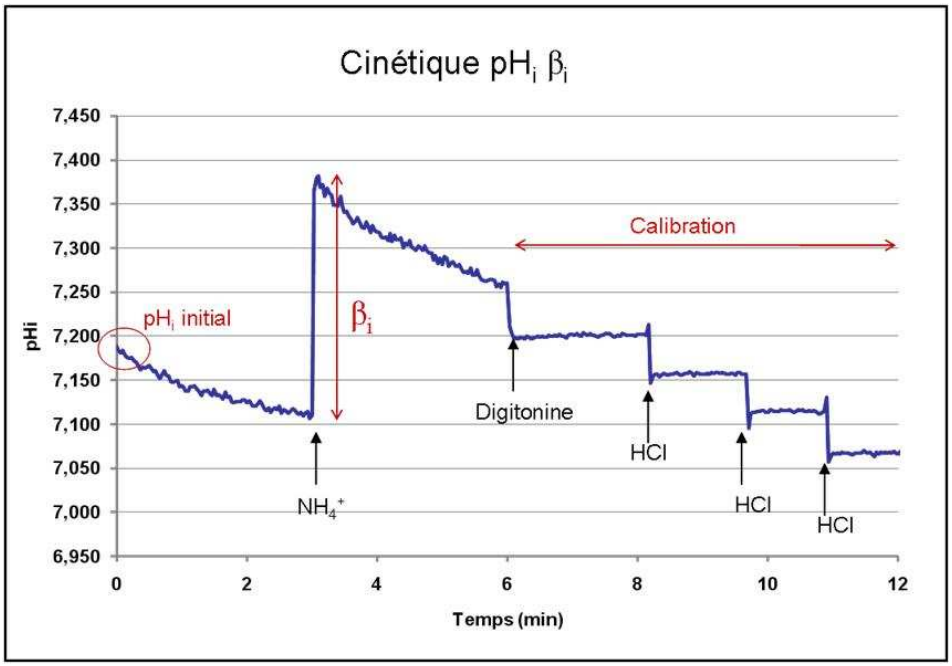


Figure 23 : Cinétique de mesure du pH intracellulaire à l'équilibre et du pouvoir tampon.

d) Mesure de l'activité de l'échangeur sodium-proton

L'échangeur sodium-proton possède un rôle de défense des cellules contre une acidification intracellulaire. Il est peu actif à pH neutre alors que lorsque le pH_i devient acide, son activité augmente dans le but d'expulser les protons en excès. Il est donc nécessaire pour pouvoir étudier son activité de se placer dans des conditions ou l'échangeur fonctionne, c'est-à-dire dans des cellules acidifiées de manière artificielle.

Les cellules sont acidifiées par la technique du pré-pulse d'ammonium (Boron and De Weer, 1976). Le NH_4Cl est ajouté à une concentration finale de 20 mM pendant 3 minutes dans le milieu extracellulaire induisant une rapide alcalinisation, suivie d'une acidification plus lente due à l'entrée des ions NH_4^+. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 x g pendant 5 minutes et remise en suspension dans 2 mL de solution sans NH_4Cl pour procéder à l'acidification et sans sodium pour empêcher l'échangeur de fonctionner en dehors des mesures. Lorsque les ions NH_3 et NH_4^+ sont retirés du milieu, les NH_4^+ libèrent des protons dans le milieu intracellulaire et le pH_i devient plus acide que sa valeur initiale. La diminution du pH est le reflet de l'accumulation des NH_4^+ qui produiront plus de protons que présents initialement. Après ajout de sodium (130 mM de NaCl) l'échangeur sodium-proton peut à nouveau jouer son rôle (Figure 24), et la vitesse l'alcalinisation dépendra de l'activité de l'échangeur : v_i (unité pH/min) = $\Delta pH_i / \Delta t$.

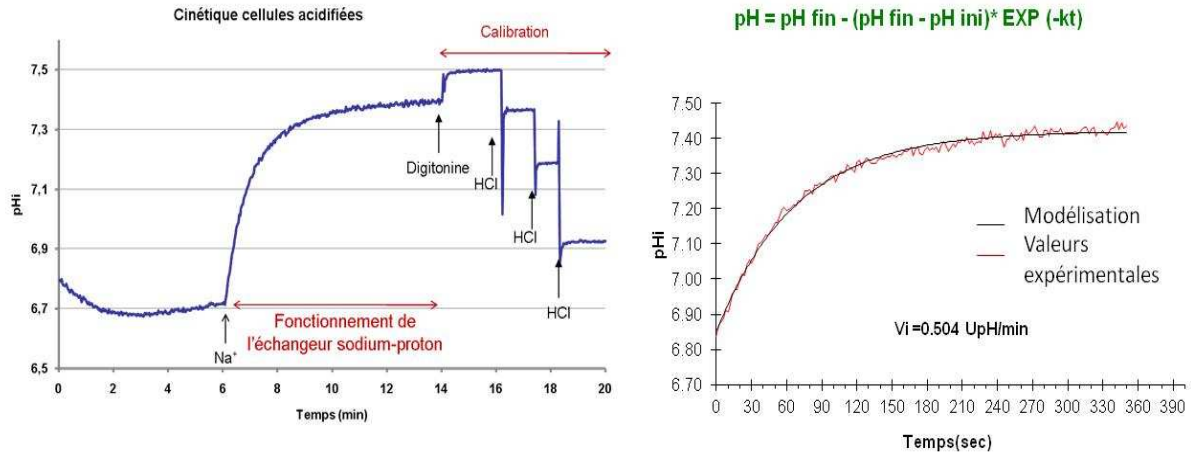


Figure 24 : Cinétique de mesure de l'activité de l'échangeur sodium-proton sur des cellules acidifiées par un pré-pulse d'ammonium.

La vitesse d'alcalinisation peut être évaluée en modélisant la courbe obtenue par une exponentielle (Simchowitz and Roos, 1985) à l'aide de l'équation suivante : $pH_t = pH_{fin}-(pH_{fin}-pH_{ini})\ e^{-kt}$

où pH_t : pH_i à un temps t

pH_{fin} : pH_i stabilisé après l'ajout de Na^+

pH_{ini} : pH_i au début de l'alcalinisation

k : constante de temps obtenue grâce à un ajustement par la méthode des moindres carrés

L'ajustement des valeurs expérimentales au modèle exponentiel par la méthode des moindres carrés (fonction solveur d'Excel, Microsoft office) permet de déterminer pH_{fin}, pH_{ini} et k. Le calcul de la vitesse initiale d'alcalinisation est ensuite effectué : v_i (upH/min) = $\Delta pH_i / \Delta t = k(pH_{st}-pH_{init})$ (Gore *et al.*, 1994). La vitesse initiale d'alcalinisation est rapportée en flux net de protons (µM H^+ / seconde) grâce au produit de la vitesse d'alcalinisation et du pouvoir tampon $J_{H+} = v_i \times \beta_i$. Différentes solutions ont été utilisées à la place du NaCl afin de s'assurer de l'implication du sodium dans la vitesse l'alcalinisation induite par l'ajout de NaCl : choline Cl 130 mM, NMDG 130 mM, Na_2SO_4 65 mM, NaCl 110 mM + $NaHCO_3$ 20 mM.

2. Mesure du pH périmembranaire

La mesure du pH extracellulaire dans l'environnement proche de la membrane plasmique permet d'avoir le reflet du transport de protons vers l'environnement extracellulaire. Cela est possible avec la molécule fluorescente N-(Fluorescein-5-Thiocarbamoyl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (fluorescéine-DHPE, Thermo Fischer Scientific, France). Ce fluorophore est composée d'un phospholipide couplé à une molécule de fluorescéine (Figure 25). Il est formé d'une phosphatidyl éthanolamine reliée à deux acides palmitiques grâce au squelette glycérol, la fluorescéine étant couplée à l'éthanolamine. Cette sonde fluorescente est capable de s'incorporer dans le feuillet externe de la membrane plasmique grâce au phospholipide, et permet par conséquent la mesure de fluorescence dans l'environnement périmembranaire. Les valeurs de fluorescence obtenues sont basées sur les

propriétés de fluorescence dépendante du pH de la fluorescéine et permettent donc de mesurer le pH périmembranaire (pH_m).

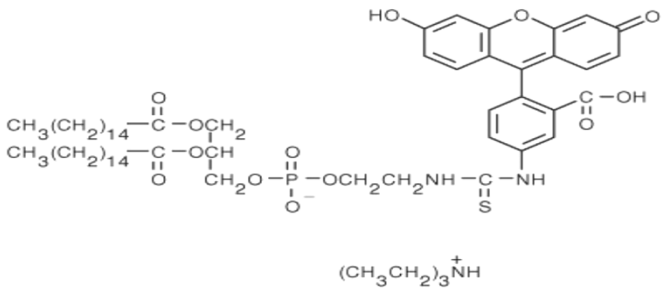


Figure 25 : Structure de la molécule de DHPE.
Source : Molecular Probes®, Invitrogen

Les cellules sont cultivées sur des boites de Petri munies d'une surface de culture en verre (Fluorodish™) à une densité permettant d'avoir des cellules isolées (6 000 cellules par cm²). Les cellules sont incubées dans une solution de DMEM sans SVF contenant 1 µg / mL de fluorescéine-DHPE pendant une heure à 37°C. L'excès de fluorophore est éliminé par deux lavages dans une solution physiologique saline (PSS, composition en Tableau XIV) dans laquelle les mesures s'effectuent à température ambiante. La boite de culture est installée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, France) équipé d'une lampe xénon et d'un monochromateur (Cairn Optoscan, UK). Une cellule isolée est choisie afin de procéder aux mesures de fluorescence avec une longueur d'onde d'émission de 535 nm et deux longueurs d'ondes d'excitation ; 485 nm dépendante du pH et 440 nm indépendante du pH. Un dispositif de perfusion permet d'établir un flux à proximité de la cellule pour que l'environnement extracellulaire de la cellule soit dans une solution de composition choisie et constamment renouvelée. Le signal de fluorescence obtenu est amplifié par un photomultiplicateur puis converti en valeur numérique par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instrument, USA). Les données sont analysées à l'aide des logiciels Clampfit 8.2 (Axon instrument, USA) et Origin 7.0 (Microcal Software, USA).

Pour chaque cellule, une calibration est effectuée à l'aide d'une solution hyperpotassique (Tableau XII) contenant 10 µM de nigéricine (N7143, Sigma France), ajustée aux pH de 7,2, 7,4 et 7,6 à l'aide de KCl et d'HCl. La nigéricine est un ionophore rendant les cellules

perméables au potassium et aux protons. Elle permet donc en présence d'une même concentration en potassium intracellulaire et extracellulaire de fixer le pH intracellulaire et périmembranaire au pH de la solution perfusée. Le pH_m est calculé à partir du rapport de fluorescences émises à 535 nm pour des excitations de 485 et 440 nm après soustraction du bruit de fond. La calibration permet de convertir les valeurs de rapport de fluorescence en valeurs de pH_m.

Tableau XII : Composition de la solution hyperpotassique.

COMPOSE	CONCENTRATION EN mM
$CaCl_2$	1,26
$MgSO_4$	0,8
KCl	120
KH_2PO_4	0,44
NaCl	20
Na_2HPO_4	0,337
D-Glucose	5,55
Hepes	20

B. Mesure de l'activité de l'échangeur sodium-proton par l'influx de lithium intracellulaire

Il est également possible d'étudier le fonctionnement des échangeurs sodium-proton par des mesures d'entrée de sodium dans les cellules. Cette technique a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent Counillon à Nice (Milosavljevic *et al.*, 2010). Cette technique permet des mesures de l'affinité de l'échangeur pour les protons intracellulaires et pour le sodium extracellulaire. Ces mesures, initialement développées par l'équipe du Dr. Jacques Pouyssegur (Pouyssegur *et al.*, 1984) utilisaient du sodium radioactif (Na^{22}) pour effectuer les mesures d'activité des échangeurs sodium-proton. Les échangeurs sodium-proton étant également perméables au lithium (Li), il est possible de mesurer l'entrée de lithium dans les cellules.

L'affinité de l'échangeur pour le lithium, et donc pour le sodium est déterminée, après acidification des cellules, par un apport d'une concentration croissante de Li extracellulaire aux cellules. L'incubation avec la solution contenant le lithium déclenche le fonctionnement de l'échangeur qui va faire rentrer un Li^+ dans la cellule en échange de la sortie d'un H^+. Les

mesures d'affinité de l'échangeur pour les protons intracellulaires sont réalisées en acidifiant les cellules à différents pH_i allant de 5,2 à 7 puis en les incubant avec une même concentration de lithium extracellulaire. Dans ces deux types de mesures la concentration en lithium intracellulaire est mesurée par spectrométrie d'absorption atomique. L'échantillon, déposé dans un four en graphite est séché puis atomisé par une élévation de la température allant jusqu'à 2800°C. L'absorbance du gaz atomique ainsi créée est mesurée à 670,8 nm, correspondant à l'absorption du lithium et est directement proportionnelle à la concentration en lithium dans les cellules. Les valeurs d'absorbances obtenues pour les échantillons sont comparées à une gamme d'étalonnage de lithium. Cette méthode employée pour mesurer l'activité de l'échangeur sodium-proton présente l'avantage de pouvoir mesurer les différents paramètres d'affinité de l'échangeur pour le sodium extracellulaire et d'activation par les protons intracellulaires de manière plus reproductible et plus sensible que des mesures de fluorescences, c'est pourquoi elle a été utilisée de manière complémentaire aux mesures de pH intracellulaire par fluorescence. La limite étant la concentration en lithium des échantillons qui doit se situer dans la gamme de détection du spectromètre d'absorption atomique.

Pour les mesures d'affinité de l'échangeur pour le sodium extracellulaire, les cellules, cultivées à confluence sur des plaques 24 puits, sont acidifiées à environ 5,2 par une incubation de deux heures dans une solution contenant 50 mM de NH_4Cl suivie de deux lavages rapides dans un milieu de rinçage (composition en Tableau XIII) ne contenant ni NH_4Cl, ni sodium ou lithium. Les cellules sont ensuite mises en présence, pendant 3 minutes, de différentes concentrations de LiCl allant de 1 à 120 mM préparées dans la solution de rinçage.

Dans le cas des mesures d'activation de l'échangeur par les protons intracellulaires (Figure 26), les cellules sont acidifiées de 5,2 à 7,0 soit par une incubation de deux heures avec une solution contenant 50 mM de NH_4Cl ou par une incubation de 10 minutes dans une solution hyperpotassique ajustée aux pH de 6,2 / 6,4 / 6,6 / 6,8 / 7 contenant 2,5 µM de nigéricine. Cette solution, de la même manière que pour les mesures de pH périmembranaire, permet d'équilibrer le pH intracellulaire avec celui de la solution contenant la nigéricine au pH voulu. La solution hyperpotassique contenant la nigéricine est retirée puis les cellules sont incubées pendant 10 minutes avec des solutions hyperpotassiques aux mêmes pH que précédemment

contenant 5 % de BSA ce qui permet à la membrane de se reformer sans la nigéricine. Les cellules sont lavées deux fois dans la solution de rinçage puis incubées pendant 3 minutes avec 1 mM de Li^+. La composition des solutions est décrite dans le Tableau XIII. Le lithium est retiré puis l'entrée de Li^+ par l'échangeur sodium-proton est stoppée par 4 lavages dans du DPBS froid. Les cellules sont solubilisées et grattées dans 250 µL d'acide nitrique dilué à 25 %. Le volume des échantillons est complété à 1 mL avec de l'eau puis l'absorbance est mesurée avec un spectromètre d'absorption atomique (Zeeman furnace system, Solaar 969, Thermo Optek, USA).

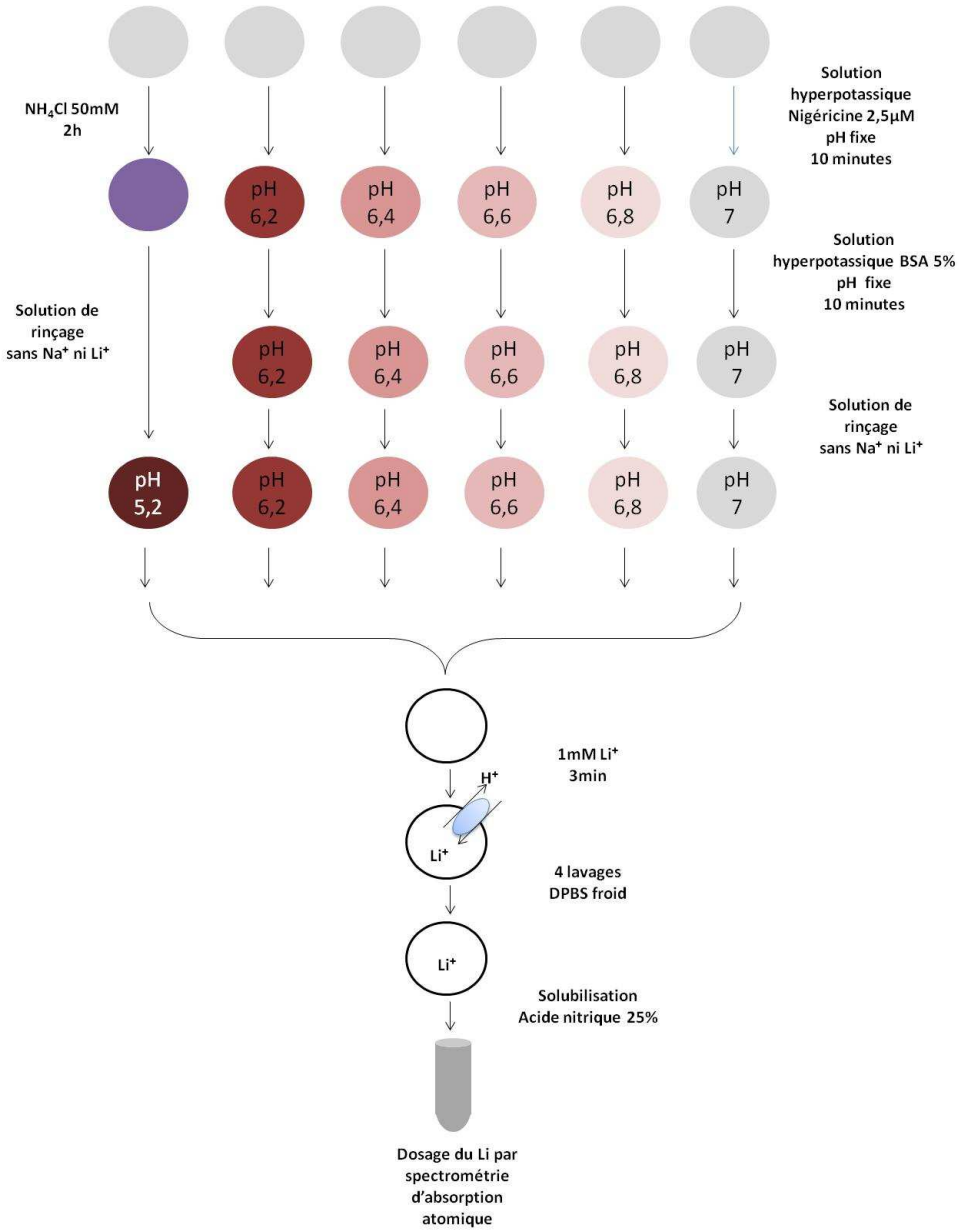


Figure 26 : Protocole utilisé pour les mesures d'influx de lithium intracellulaire

Tableau XIII : Composition des solutions utilisées pour les mesures d'entrée de lithium par l'échangeur sodium-proton.

Le pH des solutions est ajusté avec du KOH ou de l'HCl

CONCENTRATION EN mM	SOLUTION DE NH_4Cl	SOLUTION DE RINÇAGE	SOLUTION HYPERPOTASSIQUE
NH_4Cl	50	-	-
NaCl	-	-	-
Choline Cl	70	120	-
KCl	5	5	140
$MgCl_2$	1	1	1
$CaCl_2$	2	2	1
Glucose	5	5	-
MOPS	15	-	-
HEPES	-	15	
MES	-	-	20
pH	7,4	7	6,2 / 6,4 / 6,6 / 6,8 / 7

V. Electrophysiologie cellulaire : technique du patch clamp

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. Il existe deux types de mesures en patch clamp, le courant imposé (current clamp) qui permet l'étude de la variation de potentiel membranaire ou le potentiel imposé (voltage clamp) qui permet l'étude des courants ioniques en réponse à un potentiel imposé à la membrane.

L'établissement d'un contact étroit entre une microélectrode de verre généralement d'un diamètre de l'ordre de 1 µm et la membrane cellulaire permet un accès électrique à une portion de membrane ou à la cellule entière. L'accolement de la microélectrode à la membrane cellulaire, dont la valeur de la résistance doit être supérieur à 1 GigaΩ (appelé Giga seal) délimite une zone appelée « patch ». Lorsqu'un potentiel est appliqué à la membrane cellulaire via la microélectrode, deux grands types de courants peuvent être mesurés : les courants capacitifs et les courants ioniques. Les courants capacitifs sont des courants transitoires qui apparaissent lors de l'application d'une différence de potentiel et sont dues aux propriétés bioélectriques passives des membranes que se comportent comme des condensateurs électriques et développent une capacité (exprimée en Farads, F). Ce courant capacitif sera utilisé pour estimer la taille des cellules puisque les membranes cellulaires présentent généralement une capacité de 1 µF / cm². Les courants ioniques sont le reflet du déplacement des ions à travers les canaux ioniques et tout autre transporteur membranaire électrogène.

Il existe plusieurs configurations possibles entre la pipette et la membrane cellulaire permettant des mesures de courant globaux ou de courants unitaires. La configuration utilisée lors de cette étude est la configuration cellule entière patch rompu (« whole cell ») obtenue après rupture de la membrane présente sous la microélectrode et permettant de mesurer les courants ioniques de la cellule entière.

B. Méthode

1. Installation du poste de patch clamp

Le microscope inversé (Nikon® Eclipse® TE 2000, Nikon, France) sur lequel est placée la boite de Petri contenant les cellules est disposé sur une table anti-vibration entourée d'une cage de Faraday reliée à la terre. Un système de perifusion composé de capillaires et de réservoirs contrôlés par des électrovannes, placé à proximité de la cellule à l'aide d'un micromanipulateur hydraulique (MMN-1, Narishige, Japon) permet de contrôler la solution entourant la cellule étudiée. La micropipette de verre remplie de milieu intrapipette (MIP, Tableau XIV) est placée sur la tête de l'amplificateur de patch clamp au contact d'un filament d'argent chloruré et approchée vers la cellule à l'aide d'un micromanipulateur piézoélectrique (MP-225, Sutter Instrument®, USA). Le circuit électrique est fermé par la présence d'une électrode de référence formée d'une pastille d'argent enrobée d'une pellicule de chlorure d'argent et qui baigne dans la solution saline extracellulaire. L'électrode de mesure et l'électrode de référence sont reliées à un amplificateur (Axopatch 200-B, Axon Instruments, USA) et permettent de convertir les flux d'ions crées par l'ouverture des canaux ioniques en flux d'électrons vers l'amplificateur suivant la réaction : $Cl^- + Ag \leftrightarrow AgCl + e^-$. Le courant mesuré sera ensuite amplifié après avoir été converti en tension. Le signal obtenu est filtré afin de réduire le bruit de fond par un filtre analogique à une fréquence de 2 kHz puis le signal analogique est converti en signal numérique avec une fréquence d'échantillonnage de 10 à 50 kHz, suivant le protocole, par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) qui transmet le signal à un ordinateur. Le convertisseur permet également de convertir le signal numérique d'imposition d'une différence de potentiel en un signal analogique. Les protocoles d'imposition du voltage et de mesure des courants sont gérés par le logiciel pClamp 8 (Axon Instruments, USA).

2. Préparation des cellules, micropipettes et solutions

Les cellules sont ensemencées au moins 24h avant l'expérience dans des boites de Petri de 35 mm de diamètre à une densité de 15 000 cellules par mL. Les protéines présentes dans le milieu de culture pouvant empêcher l'établissement du « seal », le milieu de la boite de culture contenant les cellules est remplacé par une solution physiologique saline (PSS) de composition proche du milieu extracellulaire (Tableau XIV).

La micropipette de verre est un élément clé pour l'obtention du « seal » et la mesure des courants. Elle permet l'imposition du potentiel à la membrane et la mesure du courant. La nature du verre utilisé, la forme de la pipette ainsi que le diamètre de celle-ci sont des paramètres qui doivent être contrôlés pour avoir les meilleures chances d'obtention du Giga seal. Le verre utilisé pour la formation des pipettes pour la plupart de nos expériences est un capillaire de verre à hématocrite dit « verre mou ». Il existe un autre type de verre dit « dur » tels que les verres borosilicatés. Les tubes de verre sont chauffés en deux temps et étirés pour former des micropipettes ayant des diamètres de l'ordre de 1 µm à l'aide d'une étireuse verticale (PP-830, Narishige, Japon). Le diamètre de la pipette peut être contrôlé par la mesure de sa résistance qui doit être comprise entre 3 et 6 MΩ. La pipette est remplie d'un milieu intrapipette (MIP) d'une composition proche d'un milieu intracellulaire (Tableau XIV).

Tableau XIV : 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 avec du KOH.

COMPOSITION EN mM	PSS	MIP
NaCl	140	-
K-glutamate	-	125
KCl	4	20
NaH_2PO_4	0,33	-
$CaCl_2$	2	0,37
$MgCl_2$	1	1
Mg-ATP	-	1
HEPES	10	10
EGTA	-	1
D-glucose	11,1	-

3. Mesure des courants ioniques en configuration cellule entière

La micropipette de verre est approchée à proximité de la cellule puis accolée à l'aide d'une légère dépression pour permettre l'établissement du Giga seal. La résistance du seal doit être la plus importante possible pour éviter le passage d'ions entre la membrane et la pipette (courant de fuite). Une dépression plus importante permet de rompre la membrane présente entre la pipette et la cellule pour avoir un accès électrique à toute la membrane. A cette étape,

les capacités de la membrane cellulaire et de la pipette peuvent être compensées. Les courants mesurés au cours de cette étude étant des courants sodiques rapides, il est nécessaire de s'assurer d'une bonne compensation de la capacité membranaire qui pourrait masquer les phénomènes rapides. La rupture de la membrane fait apparaître un nouveau paramètre : la résistance série qui est composée de la résistance de la pipette et de la résistance d'accès (due à des fragments de membrane dans la pipette qui peuvent gêner l'accès électrique à l'intérieur de la cellule) en série avec la résistance et la capacité de la membrane. Ces résistances doivent être les plus faibles possibles et sont généralement comprises entre 5 et 10 MΩ. Les capacités de pipette et de membrane sont compensées en partie par une fonction de l'amplificateur ainsi que par l'établissement d'un protocole P/n de soustraction des composantes linéaires avec n=2.

Tous les courants sont exprimés en densité de courant (pA / pF) afin de les normaliser à la taille de la cellule. L'amplitude du courant sodique est enregistré par une dépolarisation de -5 mV à partir d'un potentiel de maintien de -100 mV pendant 30 ms à une fréquence de 2 Hz. Les courants sodiques (INa) mesurés au cours de cette étude sont des courants présentant une activation et une inactivation dépendante du voltage et du temps. Plusieurs protocoles expérimentaux permettent de mesurer ces paramètres. Le protocole de courant INa en fonction du voltage permet de tracer la courbe courant-voltage et la courbe d'activation du courant (amplitude au pic du courant pour chaque dépolarisation / courant maximum). Pour cela, des dépolarisations par paliers de -5 mV ont été réalisées à partir d'un potentiel de maintien de -100 mV (où les canaux ne sont pas inactivés) entre -100 et + 60 mV pendant 50 ms à une fréquence de 2 Hz. L'inactivation ou la disponibilité des canaux sodiques en fonction du voltage est évaluée par une dépolarisation de -5 mV pendant 50 ms appliquée après chaque palier de dépolarisation du protocole courant-voltage. La courbe de disponibilité est construite en reportant l'amplitude du courant test en fonction du premier potentiel imposé. Les courbes de conductance et de disponibilité sont lissées par une fonction de Boltzmann du type : $Y=1/(1+\exp(V½-V)^{k})$ où Y correspond à la conductance ou la disponibilité, $V_{1/2}$ au voltage de demi-activation ou de demi-inactivation et k le facteur permettant de déterminer les variations de conductance ou d'inactivation en fonction du voltage. Les courants ioniques globaux ont été étudiés par un protocole courant-voltage de dépolarisation par paliers de 10 mV de -100 à +100 mV à partir du potentiel de maintien de -70 mV pendant 500 ms à une fréquence de 0,5 Hz.

VI. Techniques d'étude de localisation subcellulaire des protéines

A. Immunofluorescence

La technique d'immunocytochimie permet de localiser l'expression d'une protéine sur une cellule par microscopie de fluorescence. Elle est basée sur la complémentarité antigène-anticorps via la fixation d'un anticorps sur un antigène puis la détection de cette fixation par un second anticorps couplé à une molécule fluorescente. L'excitation de la molécule fluorescente dans une gamme de longueur d'onde spécifique puis la mesure de son émission à une longueur d'onde précise permet l'étude de la localisation de cette protéine dans la cellule.

Les cellules sont cultivées sur des lames de verres composées de puits compartimentés (Lab-tek™ II, BD Biosciences, France) à une densité permettant d'obtenir des cellules isolées (5000 cellules par cm^2). Les cellules sont ensemencées sur une fine couche de Matrigel™ pour mimer la matrice extracellulaire. Contrairement aux mesures d'activité protéolytique de la matrice extracellulaire, la couche de Matrigel™ doit être fine pour que la culture de cellules s'effectue sur la matrice et non en trois dimensions. Pour cela, le Matrigel™ est décongelé lentement à +4°C puis est dilué au tiers dans du DMEM sans SVF. Cette solution est répartie de façon homogène dans les puits puis l'excès est immédiatement retiré. Après 30 minutes d'incubation dans une étuve à 37°C pour permettre au Matrigel™ de se solidifier, les cellules sont ensemencées et cultivées pendant 24h. Les cellules sont fixées avec une solution contenant 4 % de formaldéhyde et 4 % de saccharose dans 0,1 % de DPBS froid pendant 20 minutes à température ambiante. L'action du formaldéhyde est stoppée par 3 lavages de 3 minutes dans du DPBS contenant 100 mM de glycine. Les épitopes reconnus par les anticorps utilisés étant intracellulaires, les cellules doivent être perméabilisées pour permettre à l'anticorps de traverser la membrane cellulaire et d'accéder à son antigène. Les cellules sont perméabilisées pendant 3 minutes avec du DPBS contenant 0,1 % de Triton X-100. Les cellules sont lavées 3 fois 3 minutes avec du DPBS puis les sites non spécifiques sont saturés par une solution contenant 3 % de BSA préparée dans du DPBS. Les anticorps primaires, dilués dans du DPBS contenant 1 % de BSA, sont incubés pendant une nuit à 4°C sous agitation. L'anticorps utilisé pour détecter NHE1 est dilué au 1/100ème (K16 sc-33325, Santa-

Cruz, Tebu-Bio, France). Le canal $Na_V1.5$ est détecté à l'aide d'un anticorps anti-$Na_V1.5$ humain (Xu *et al.*, 2005) dilué au 1/200ème. Après 3 lavages de 10 minutes dans du DPBS, les anticorps secondaires, dilués dans du DPBS contenant 1 % de BSA sont incubés pendant 1h à température ambiante sous agitation. Pour NHE1 l'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-chèvre couplé à du DyLight™ 488 (605-741-002, Rockland, Tebu-Bio, France) dilué à 1/10 000. Un anticorps secondaire anti-lapin couplé à du TexasRed® (T2767 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) est utilisé pour détecter $Na_V1.5$ et est dilué à 1/800. Les préparations sont lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du DPBS puis les puits compartimentés sont retirés. Le milieu de montage SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (S36939 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) est ajouté sur la lame qui sera ensuite recouverte d'une lamelle couvre-objet d'une épaisseur de 0,17 mm. Les marquages sont visualisés à l'aide du microscope d'épifluorescence Eclipse Ti-S (Nikon, France) équipé d'une lampe à vapeur de mercure (C-SHG1, Nikon France) et d'une caméra (Digital camera DXM 1200F, Nikon France). Les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont sélectionnées à l'aide de cubes contenant des filtres et un miroir dichroïque : GFP-3035B, TXRED 4040B, DAPI 5060B (Semrock, Optoprim France). L'acquisition s'effectue à un grossissement de 400 x à l'aide du logiciel NIS-Eléments V3.0 (Nikon France).

B. Isolement des radeaux lipidiques

La purification des radeaux lipidiques, afin d'analyser leur contenu protéique peut être effectuée en suivant deux techniques différentes. L'une d'elle utilise leur propriété d'insolubilité dans des détergents doux d'où leur nom parfois employé de «membranes résistantes aux détergents ». L'autre est basée sur leur composition lipidique. En effet, les radeaux lipidiques sont des zones de membrane riches en cholestérol et en sphingolipides ce qui conduit à leur faible densité comparée aux autres zones membranaires. Il est donc possible de les séparer sur un gradient de densité ; les radeaux lipidiques se retrouvent « flottant » dans le gradient d'où leur nom de radeaux. Cette dernière technique a été utilisée pour fractionner les membranes cellulaires et déterminer par western blotting l'expression de différentes protéines dans les radeaux lipidiques (Calaghan *et al.*, 2008; Ostrom and Liu, 2007). Cette technique consiste à lyser les cellules et extraire les protéines dans un tampon carbonate de sodium sans détergent. Les membranes cellulaires sont clivées en fragments plus petits idéalement de la taille des radeaux lipidiques par sonication. L'ultracentrifugation sur gradient

de densité permet de séparer les radeaux lipidiques (moins denses) qui se retrouvent en haut du gradient des autres membranes cellulaires qui sont situées en bas du gradient avec les protéines solubles.

Les cellules sont ensemencées dans 5 boites de 175 cm^2 de manière à avoir une confluence de 80 % et à obtenir 10 à 15 mg de protéines totales. L'extraction des protéines s'effectue sur de la glace et avec des solutions et des tubes préalablement réfrigérés. Après deux lavages avec du DPBS froid, les cellules sont lysées dans 2,5 mL de tampon carbonate de sodium (500 mM de Na_2CO_3, 0,5 mM d'EDTA et 2 % d'inhibiteurs de protéases, P8340 sigma, France) pour les 5 boites soit un ajout séquentiel du tampon de lyse et un grattage des boites les unes après les autres dans le même tampon de lyse. Le lysat obtenu est fluidifié par plusieurs passages à travers une aiguille de 23G puis la sonication s'effectue en trois fois 20 secondes à puissance maximum à l'aide d'une sonde à ultrasons. Le gradient de densité utilisé est un gradient discontinu de saccharose dont la composition des solutions est présentée dans le Tableau XV. Le lysat (2 mL contenant 10 à 15 mg de protéines) est déposé dans un tube pour ultracentrifugation (344059, Beckman, Thermo Electron, France) puis mélangé doucement au vortex avec 2 mL d'une solution à 90 % de saccharose pour constituer la première partie du gradient contenant donc 45 % de saccharose et l'échantillon. Une solution de 4 mL de 35 % de saccharose est déposée de manière à empêcher la formation de bulles dans le gradient et de gouttes sur la paroi du tube. Une démarcation doit apparaître entre les deux densités de saccharose. De la même manière, 5 mL d'une solution de 5 % de saccharose sont déposés pour compléter le gradient. Les tubes sont pesés, équilibrés puis centrifugés pendant 17h à 188 000 x g (39000 rpm) à 4°C (centrifugeuse WX Ultra 90 Sorvall WX Ultra Series rotor SW41, Thermo Scientific, France). L'accélération doit être lente et la décélération sans frein pour ne pas perturber le gradient de densité.

Après centrifugation, un nuage blanc correspondant aux radeaux lipidiques peut être observé dans la partie supérieure du gradient. Des fractions de 1 mL sont collectées à l'aide d'une aiguille longue et de seringues à partir du fond du tube. Les fractions sont numérotées de 1 à 12, la fraction 12 étant la plus dense. La quantité de protéines est dosée pour chaque fraction, les radeaux lipidiques correspondent aux fractions présentant un pic de protéine, généralement les fractions 5 et 6. Les protéines contenues dans les différentes fractions collectées sont analysées par western blotting en déposant une quantité identique de protéines. La cavéoline-1

est utlisée comme marqueur de radeaux lipidiques et la β-adaptine pour identifier les autres membranes.

Tableau XV : Composition des solutions de saccharose utilisées pour former le gradient de densité.

Pour 50mL	90 % de saccharose	35 % de saccharose	5 % de saccharose
MBS (Volume en mL) Solution stock 10X	5	5	5
Volume d'eau à ajouter avant d'ajuster le pH à 6,5 (mL)	15	20	30
Na_2CO_3 (volume en mL) Solution stock 1,5 M	0	8,3	8,3
Quantité de saccharose (g)	45	17,5	2.5

Composition du MES-buffered saline (MBS) 10X= MES 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM.

C. Isolement des invadopodes

Les invadopodes sont des zones de membranes spécialisées dans l'adhésion et la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses. Lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice en deux dimensions, les invadopodes sont retrouvés sur la membrane « ventrale » de la cellule en contact direct et ancrés dans la matrice. La présence de protéines d'intérêt dans les invadopodes peut être déterminée par des techniques de fractionnement cellulaire ou par microscopie. La mise au point de ces techniques a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Reshkin à Bari en Italie d'après (Busco *et al.*, 2010).

1. Fractionnement cellulaire

Les invadopodes peuvent être isolés des corps cellulaires par un fractionnement cellulaire, puis la composition protéique de chaque fraction est analysée par western blotting. Les cellules sont cultivées sur une fine couche de gélatine (gélatine de peau de porc de type A, G2500 Sigma, France) permettant le grattage de la surface contrairement au Matrigel™ qui est

moins rigide (Figure 27). La gélatine est un mélange hétérogène de protéines solubles de haut poids moléculaire présentes dans le collagène.

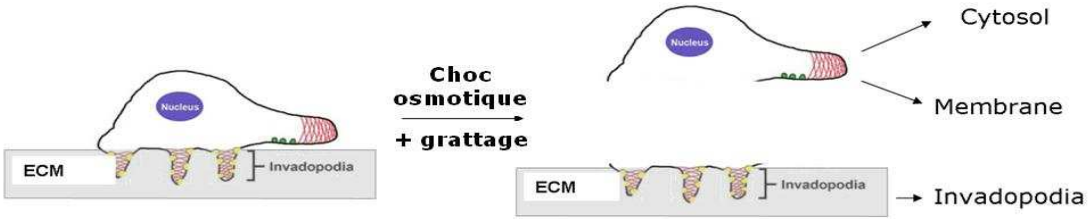


Figure 27 : Fractionnement cellulaire et enrichissement des invadopodes.
Modifié d'après Weaver, 2006.

a) Préparation des boites de culture et ensemencement des cellules

Afin d'obtenir une quantité suffisante de protéines pour chaque fraction, la culture s'effectue sur 5 boites de Petri de 15 cm de diamètre. Ces boites sont recouvertes d'une fine couche de gélatine préalablement à l'ensemencement des cellules. Pour cela de la gélatine à une concentration de 20 mg / mL est préparée dans du DPBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} et dissoute pendant une heure à 37°C. La gélatine se gélifiant à 4°C, les boites de Petri sont préalablement refroidies sur de la glace. La gélatine est déposée dans les boites de Petri (15 mL par boite) puis l'excès est retiré et la surface est laissée à solidifier pendant 10 minutes sur de la glace. Les boites sont placées horizontalement sur la glace à l'aide d'un niveau afin d'assurer une couche uniforme de gélatine. La gélatine est ensuite fixée pendant 15 minutes à l'aide de glutaraldéhyde 0,5 % froid préparé dans du DPBS. Après la fixation, les boites sont lavées 3 fois 5 minutes dans du DPBS par agitation douce puis désinfectées pendant une heure sous une hotte à flux laminaire avec 20 mL d'éthanol à 70 % par boite. L'éthanol est retiré par 3 lavages dans du DMEM sans SVF. Les cellules sont ensemencées à une densité de 5 millions de cellules par boite et laissées dans l'étuve pendant 18 à 24h avant le fractionnement.

b) Fractionnement cellulaire

Les corps cellulaires sont séparés de la gélatine contenant les invadopodes par un choc osmotique et un grattage doux (Figure 27). Les cellules sont d'abord lavées 3 fois avec du

DPBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} auquel est ajouté 1 mM de $CaCl_2$ et 0,5 mM de $MgCl_2$ puis 2 fois avec du DPBS dilué au 5ème contenant 1 mM de $CaCl_2$ et 0,5 mM de $MgCl_2$. Le choc osmotique est effectué à l'aide de 3 mL par boite de tampon de lyse cytosol (composition en Tableau XVI) pendant 15 minutes sous agitation douce. Les corps cellulaires sont séparés de la gélatine par un grattage doux circulaire avec une pipette pasteur en forme de L. Le matériel est collecté et homogénéisé avec une seringue et une aiguille 26G puis centrifugé à 3 500 x g pendant 10 minutes pour éliminer les noyaux et les mitochondries. Le surnageant est centrifugé à 100 000 x g pendant 1h10 à 4°C pour séparer les membranes du cytosol. Le surnageant correspondant à la fraction cytosol est concentré jusqu'à environ 400 µL grâce aux filtres à centrifuger qui retiennent les protéines supérieures à 3 kDa puis 10 kDa (Amicon Ultra-15, PLBC Ultracel-PL Membrane, 3 kDa, Amicon Ultra-4, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa, Millipore, France). Le culot correspondant à la fraction des membranes est remis en suspension dans 150 µL de tampon de lyse membranes et invadopodes (composition en Tableau XVI). La gélatine contenant les invadopodes est lavée 2 fois avec du DPBS pour enlever les fragments de corps cellulaires restant puis elle est grattée dans 500 µL de tampon de lyse membranes et invadopodes avec un râteau. Les protéines sont extraites pendant 2h30 sous agitation à 4°C puis les échantillons sont centrifugés à 17 000 x g pendant 30 minutes à 4°C pour séparer la gélatine de la solution contenant les protéines. Le surnageant est concentré jusqu'à environ 300 µL à l'aide des filtres à centrifuger de 10 kDa (Amicon Ultra-4, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa, Millipore, France).

Tableau XVI : Composition des tampons de lyse.

Cytosol	Membranes et invadopodes
DPBS dilué au 1/5ème	5 mM HEPES
1 mM $CaCl_2$	0,5 mM EDTA
0,5 mM $MgCl_2$	1 mM de Dithiothréitol (DTT)
1 mM orthovanadate de sodium	1 mM orthovanadate de sodium
inhibiteurs de protéases	0,1 % NP40
	inhibiteurs de protéases
	pH 7,2

Les 3 fractions ainsi obtenues sont dosées puis analysées par western blotting pour d'une part contrôler l'efficacité de la séparation et d'autre part étudier la localisation de protéines d'intérêt. Les marqueurs de cytosol utilisés sont la β-actine et HSC70. La β-adaptine est utilisée comme marqueur de membranes et la cortactine et la FAK sont enrichies dans la fraction invadopodes.

2. Identification des invadopodes par microscopie de fluorescence

Les invadopodes sont définis comme des zones de condensation d'actine et ayant une activité de dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Ils sont donc identifiés en microscopie par des zones où actine ou protéines associées et marqueurs de dégradation sont co-localisés. Une phalloïdine, toxine se fixant sur l'actine polymérisée, couplée à un AlexaFluor594 (A12381 Alexa Fluor® 594 phalloïdin, Molecular probes, Thermo Fischer Scientific, France) ou un anticorps spécifique de la cortactine ont été utilisés pour identifier les invadopodes ainsi que des substrats de protéases (D-12054 DQ-gelatin™ Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific France) ou de la cathepsine B (MagicRed™ Cathepsin detection kit, Cathepsin B MR-$(RR)_2$ Immunochemistry Technologies, Abcys, France) qui deviennent fluorescents lorsqu'ils sont dégradés. Le substrat MagicRed™ utilise le fluorophore crésyl violet couplé à une séquence cible de la cathepsine B, $(arginine\text{-}arginine)_2$. Le crésyl violet couplé à cette séquence cible n'est pas fluorescent, il le devient lorsque la cathepsine B clive un ou deux des groupements arginine en générant une fluorescence rouge lorsqu'il est excité entre 550 et 590 nm.

Les cellules ont été ensemencées sur une fine couche de Matrigel™ de la même manière que pour la technique d'immunofluorescence dans des Lab-tek™ compartimentés, à une densité de 5000 cellules par cm^2. Dans le cas de mesure de dégradation protéolytique par la DQ-gelatin™, le substrat a été ajouté dans le Matrigel™ à une concentration de 25 µg / mL avant la solidification de la matrice. 24h après l'ensemencement, le MagicRed™ a été incubé pendant 15 minutes à 37°C à une dilution de 1/2000 dans du DPBS (à partir de la solution stock préconisée par le fabriquant). Les cellules sont fixées avec une solution contenant 4 % de formaldéhyde et 4 % de saccharose dans 0,1 % de DPBS froid pendant 20 minutes à température ambiante. L'action du formaldéhyde est stoppée par 3 lavages de 3 minutes dans

du DPBS contenant 100 mM de glycine. Les cellules ont été perméabilisées pendant 20 minutes avec une solution de DPBS contenant 50 mM de NH_4Cl, 1 % de BSA et 0,02 % de saponine. Après saturation des sites non spécifiques par 3 % de BSA et 3 % de NGS (normal goat serum) pendant 30 minutes, les anticorps primaires, préparés dans une solution de DPBS contenant 1 % de BSA, ont été incubés pendant une nuit à 4°C (Tableau XVII). Après 3 lavages de 10 minutes dans du DPBS les anticorps secondaires ont été incubés pendant 1h à température ambiante (Tableau XVII). La phalloïdine594® est incubée pendant 1h à une dilution de 1/200 dans du DPBS. Le milieu de montage ProLong Gold with Dapi (P36936 ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Molecular probes, Thermo Fischer Scientific, France) est déposé sur la lame après avoir retiré les puits compartimentés puis une lamelle couvre-objet d'une épaisseur de 0,17 mm est déposée pour recouvrir l'échantillon.

L'acquisition ainsi que l'analyse des images s'effectue à l'aide du microscope de fluorescence Ti-S (Nikon, France) et du logiciel NIS-Eléments V3.0 (Nikon, France) de la même manière que pour l'immunofluorescence. L'analyse de l'activité des invadopodes est effectuée par l'identification des zones de co-localisation entre l'actine et la dégradation de la DQ-gelatin™ grâce à la définition du seuil d'un filtre pour chaque canal de fluorescence. Une image est ensuite créée avec seulement les pixels communs entre les deux filtres puis superposée sur l'image initiale. La densité de pixels représentant la dégradation de la matrice associée aux invadopodes est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ 1.45s (National Institue of Health, USA) puis rapportée au nombre de cellules du champ. Un index de circularité est calculé par le logiciel ImageJ 1.45s avec la formule : 4π x [aire]/[périmètre]^2. Une valeur d'index de circularité proche de 0 correspond à une forme allongée des cellules alors que la valeur 1 indique un cercle parfait.

Tableau XVII : Liste des différents anticorps primaires et secondaires utilisés pour la microscopie de fluorescence.

Anticorps Primaires

Protéine recherchée	Anticorps	**Référence**	**Fournisseur**	**Dilution**	**Espèce réactive**
NHE1	IgG anti-NHE1	(K-16): sc-33325	Santa-Cruz, Tebu-Bio France	1/100	chèvre
Canaux sodiques Na_V	IgG1 Monoclonales anti-sodium channel (pan) clone K58/35	S8809	Sigma, France	1/200	souris
$Na_V1.5$	IgG anti-$Na_V1.5$	S0819 lot 061M1688	Sigma, France	1/200	lapin
$Na_V1.5$	IgG anti-$Na_V1.5$		(Xu *et al.*, 2005)	1/70	lapin
Cortactine	IgG1 monoclonales anti-cortactine (p80/85) clone 4F11	05-180	Millipore, France	1/800	souris
Cathepsine B	IgG anti-cathepsine B	20-CR71	Fitzgerald, USA	1/200	lapin
MT1-MMP	IgG anti-MT1-MMP	AB6004	Millipore, France	1/200	lapin
Cavéoline-1	IgG monoclonales anti-cavéoline-1	3267	Cell signaling, Ozyme France	1/200	lapin

Anticorps Secondaires

Réactivité	**Anticorps**	**Référence**	**Fournisseur**	**Dilution**	**Espèce**
anti-lapin	anti-lapin IgG-AF488®	A11070	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, France	1/2000	chèvre
anti-lapin	anti-lapin IgG-TexasRed®	T2767	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, France	1/800	chèvre
anti-souris	anti-souris IgG-AF488®	A11001	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, France	1/2000	chèvre
anti-chèvre	anti-chèvre IgG-DyLight™ 488	605-741-002	Rockland, Tebu-Bio France	1/2000	singe

Les mêmes préparations ont été visualisées à l'aide d'un microscope de haute résolution N-SIM (Structured Illumination Microscopy) (Nikon Imaging Centre @ Institut Curie-CNRS). Une résolution deux fois supérieure à la limite de diffraction de la lumière est obtenue en illuminant l'échantillon par un réseau pouvant se déplacer à différents angles. Pour générer un contraste, la superposition de deux réseaux, l'un de motif inconnu constitué de l'échantillon à observer et l'autre constitué du motif d'illumination, crée une figure de lignes sombres et

claires appelée motif de Moiré. L'image obtenue contient les informations de faible résolution de microscopie classique ainsi que les informations de hautes résolutions contenues dans les motifs de Moirés. L'illumination de l'échantillon par le réseau à différentes orientation ainsi qu'à différents niveau de z conduit à l'obtention de 15 images par champ qui après reconstructions permettent d'obtenir une image en trois dimensions avec une résolution deux fois supérieure à celle d'un microscope classique (Gustafsson, 2000; Gustafsson *et al*., 2008). Les préparations cellulaires sont visualisées à l'aide d'un microscope inversé Nikon Eclipse Ti équipé d'un micromanipulateur piézoélectrique en z, de deux lasers (488 nm 100 mW et 561 nm 100 mW) et d'une caméra CCD iXon DU897 (Andor). L'objectif utilisé est un objectif à immersion à huile d'un grossissement de 100 x (CFI Plan Apo TIRF, ouverture numérique 1,49). Les images sont acquises et analysées à l'aide du logiciel NIS-Eléments V3.0 (Nikon, France).

L'étude de la co-localisation entre NHE1 et $Na_V1.5$ dans les invadopodes par microscopie confocale a été réalisée lors d'une collaboration dans le laboratoire du Pr. Reshkin (Bari, Italie). Pour ces images, les cellules ont été cultivées sur des lamelles couvre-objet recouvertes d'une couche de Matrigel™ (4 mg / mL) contenant un substrat de protéases BSA-BODIPY-FL (A2750, Molecular Probes, Eugene, USA) à une concentration de 30 µg / mL. Les cellules ont été lavées deux fois dans du DPBS puis fixées par une solution contenant 3,7 % de formaldéhyde pendant 20 minutes. Après 3 lavages de 5 minutes dans du DPBS, les cellules ont été perméabilisées à l'aide de 0,1 % de Triton X-100 puis saturée avec 0,1 % de gélatine dans du DPBS pendant 10 minutes. Les anticorps primaires anti-NHE1 (4E9, Abcam, USA) dilués à 1/250 et anti-$Na_V1.5$ (Xu *et al*., 2005) dilués à 1/70 ont été préparés dans du DPBS contenant 0,1 % de gélatine et incubés pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes dans du DPBS contenant 0,1 % de gélatine, les anticorps secondaires anti-lapin IgG-AlexaFluor® 350 et anti-souris IgG-AlexaFluor® 568 (Molecular Probes, Eugene, OR) ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles sont lavées 3 fois pendant 5 minutes dans du DPBS, rincées dans de l'eau distillée et montées sur une lame avec du milieu de montage Mowiol (Calbiochem, USA). Les cellules sont observées à un grossissement de 600 X à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP5 II AOBS équipé d'une caméra MicroMax 512 BFT (Princeton Instruments, USA) et d'une lampe à vapeur de mercure (OSRAM GmbH, Allemagne). Pour chaque cellule, 26 images de coupes ont été acquises avec un pas de 0,25 µm à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging

Corp, USA). Les images ont été traitées par déconvolution à l'aide de la fonction AutoDeblur 9.1 du logiciel AutoQuant (Troy, USA).

D. Analyse des complexes protéiques par électrophorèse en condition non dénaturante

Les complexes protéiques peuvent être identifiés par des techniques d'électrophorèses en condition native, non dénaturante (Wittig and Schagger, 2009). Pour cela, les protéines cellulaires sont extraites à l'aide de détergents doux, non ioniques afin de conserver les complexes protéiques. Le lysat ainsi obtenu est déposé sur un gel de polyacrylamide ne contenant pas de SDS afin d'effectuer l'électrophorèse. Les protéines sont chargées par un mélange de détergents neutres et anioniques ajoutés lors de l'électrophorèse. Elles migrent à travers le gel selon leur masse apparente. Lorsque deux protéines sont situées dans un même complexe protéique, la révélation de celles-ci doit faire apparaître des bandes situées aux mêmes masses moléculaires.

L'extraction des protéines se fait sur de la glace avec du matériel préalablement réfrigéré pour éviter toute dénaturation par la chaleur. Les cellules cultivées sur une boite de 75 cm² sont lavées dans du DPBS. Elles sont récoltées par un choc osmotique à l'aide de DPBS dilué au 5ème contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Réf. P2714 Sigma, France) et 1 mM d'orthovanadate pendant 15 minutes suivi d'un grattage avec un râteau. Une centrifugation à 3 500 x g pendant 10 minutes à 4°C permet d'éliminer les noyaux et les mitochondries. Le surnageant est concentré jusqu'à 100 µL avec un filtre retenant les protéines de masses moléculaires supérieures à 10 kDa (Amicon Ultra-4, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa, Millipore, France). Le tampon de lyse quatre fois concentré est ajouté au lysat (concentrations finales de 10 % de glycérol, 50 mM de Tris pH 7, 50 mM de NaCl, 0,25 % de digitonine et le cocktail d'inhibiteurs de protéases). Le lysat est homogénéisé avec une pipette et incubé pendant 30 minutes dans la glace. Une centrifugation à 30 000 x g pendant 30 minutes à 4°C permet d'éliminer les débris cellulaires. Après dosage des protéines, le surnageant est complété par 0,05 % de rouge Ponceau permettant de suivre l'électrophorèse. 150 µg de protéines sont déposées sur un gel d'acrylamide sans détergent formé d'un gradient de 4 à 15 % d'acrylamide (4–15 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Biorad, France). L'électrophorèse est réalisée à 110 volts constants pendant 3h dans un tampon contenant

25 mM de Tris et 192 mM de glycine à un pH de 8,3. Le tampon utilisé pour remplir la cathode est complété par 0,05 % de déoxycholate de sodium et 1 % de Triton-X-100. Après l'électrophorèse, le gel est incubé pendant 20 minutes dans du tampon d'électrophorèse contenant 0,1 % de SDS afin de faciliter le transfert sur une membrane de PVDF. Le transfert s'effectue à 300 mA pendant 135 minutes. Le marqueur de taille (NativeMark™ Unstained Protein Standard, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France) est utilisé pour évaluer la taille des complexes protéiques. La coloration du gel au rouge ponceau permet de faire apparaître le marqueur de taille. Les membranes sont ensuite utilisées pour un immuno-marquage similaire à celui effectué pour le western blotting.

VII. Statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (SEM) avec n correspondant au nombre de cellules ou nombre d'expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism V4 (GraphPad Software, USA). Une analyse de la variance à un facteur (One-way ANOVA) suivie d'un test de Student-Newmann-Keul's ont été utilisés pour comparer plusieurs conditions entre elles pour la migration, l'invasion, la prolifération et l'efflux de protons. Un test de Student est utilisé pour comparer deux conditions présentant une distribution Gaussienne. Lorsque le test de variance montre des variances différentes, un test de Mann-Whitney est utilisé pour comparer les différents groupes. 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 et discussion

I. Le canal sodique $Na_V1.5$ stimule l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires en augmentant l'activité de l'échangeur sodium-proton NHE1.

A. Introduction

La forte mortalité associée au cancer du sein résulte principalement du développement de métastases faisant intervenir différents mécanismes cellulaires et moléculaires tels qu'une motilité suractivée et une protéolyse de la matrice extracellulaire. Ceci permet aux cellules cancéreuses de s'échapper de la tumeur primaire afin d'envahir de nouveaux tissus.

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires connues pour générer les phénomènes électriques dans les cellules excitables. Il a été démontré qu'ils sont également capables de réguler plusieurs propriétés des cellules cancéreuses. En particulier certains canaux sodiques sont impliqués dans le phénomène d'invasivité des cellules cancéreuses (Roger *et al.*, 2003). En effet, des canaux sodiques dépendants du voltage, $Na_V1.5$, sont exprimés et fonctionnels dans une lignée de cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231 alors qu'ils ne le sont pas dans des cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives ou dans des cellules épithéliales mammaires non cancéreuses. Leur activité est responsable d'un courant sodique dit de « fenêtre » au potentiel de membrane des cellules conduisant à une entrée continue de sodium dans ces cellules. Par ailleurs, l'expression de canaux sodiques a été retrouvée sur des biopsies de tissus cancéreux mammaires où elle est corrélée à l'envahissement ganglionnaire et également dans plusieurs types de cellules cancéreuses hautement invasives. L'expression de canaux sodiques dépendants du voltage a donc été proposée comme marqueur de métastases (Fraser *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012).

L'activité du canal sodique $Na_V1.5$ (courant sodique) ne participe ni à la prolifération ni à la migration cellulaire mais est responsable d'une augmentation de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et par conséquent de l'invasivité des cellules MDA-MB-231 (Gillet *et al.*, 2009; Roger *et al.*, 2003). En effet, l'inhibition pharmacologique (tétrodotoxine) ou moléculaire (siRNA) des canaux $Na_V1.5$ diminue l'invasion de la matrice extracellulaire

de près de 40 % et réciproquement, l'augmentation du courant de fenêtre par un activateur pharmacologique, la vératridine, augmente l'invasivité des cellules MDA-MB-231. L'activité du canal semble donc nécessaire à son rôle dans l'invasivité cellulaire. De plus, l'invasivité des cellules est diminuée dans un milieu dont la concentration en sodium extracellulaire a été réduite (Gillet *et al*., 2009).

L'activité du canal $Na_V1.5$ participe à la croissance et à la dissémination des colonies de cellules MDA-MB-231 cultivées en trois dimensions dans du Matrigel™. Son inhibition réduit la taille des colonies et le nombre de cellules s'échappant de ces colonies. L'inhibition du canal réduit également la dégradation protéolytique autour de cellules cultivées en trois dimensions supportant l'influence de protéases dans ce phénomène. L'utilisation de substrats et d'inhibiteurs pharmacologiques a permis de démontrer que les cathepsines à cystéine B, H, K, L et S étaient fonctionnelles dans les cellules MDA-MB-231. Parmi celles-ci, les cathepsines à cystéine B et S sont sécrétées et participent à l'invasivité induite par l'activité du canal $Na_V1.5$. L'expression et la sécrétion des cathepsines B et S ne sont pas modifiées par l'activité du $Na_V1.5$. L'activité de ce canal semble plutôt réguler l'activité des cathepsines à cystéines, présentant une activité optimale à un pH acide. L'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ induit, en effet, une acidification intracellulaire accompagnée d'une alcalinisation périmembranaire. Son activité serait donc responsable d'une acidification périmembranaire qui pourrait permettre la potentialisation de l'activité protéolytique de protéases à activité maximale à pH acide, les cathepsines B et S sécrétées dans le milieu extracellulaire (Gillet *et al.*, 2009).

Le pH intracellulaire, et par conséquent le pH périmembranaire sont des paramètres finement régulés faisant intervenir de nombreuses protéines membranaires. L'objectif de cette étude est d'identifier les protéines régulatrices du pH responsables de l'acidification périmembranaire induite par l'activité du canal $Na_V1.5$, favorables à l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

B. Premières études sur la régulation du pH dans les cellules MDA-MB-231

Afin d'étudier la régulation du pH des cellules MDA-MB-231, l'expression des ARNm de plusieurs protéines régulatrices du pH a été étudiée par RT-PCR conventionnelle.

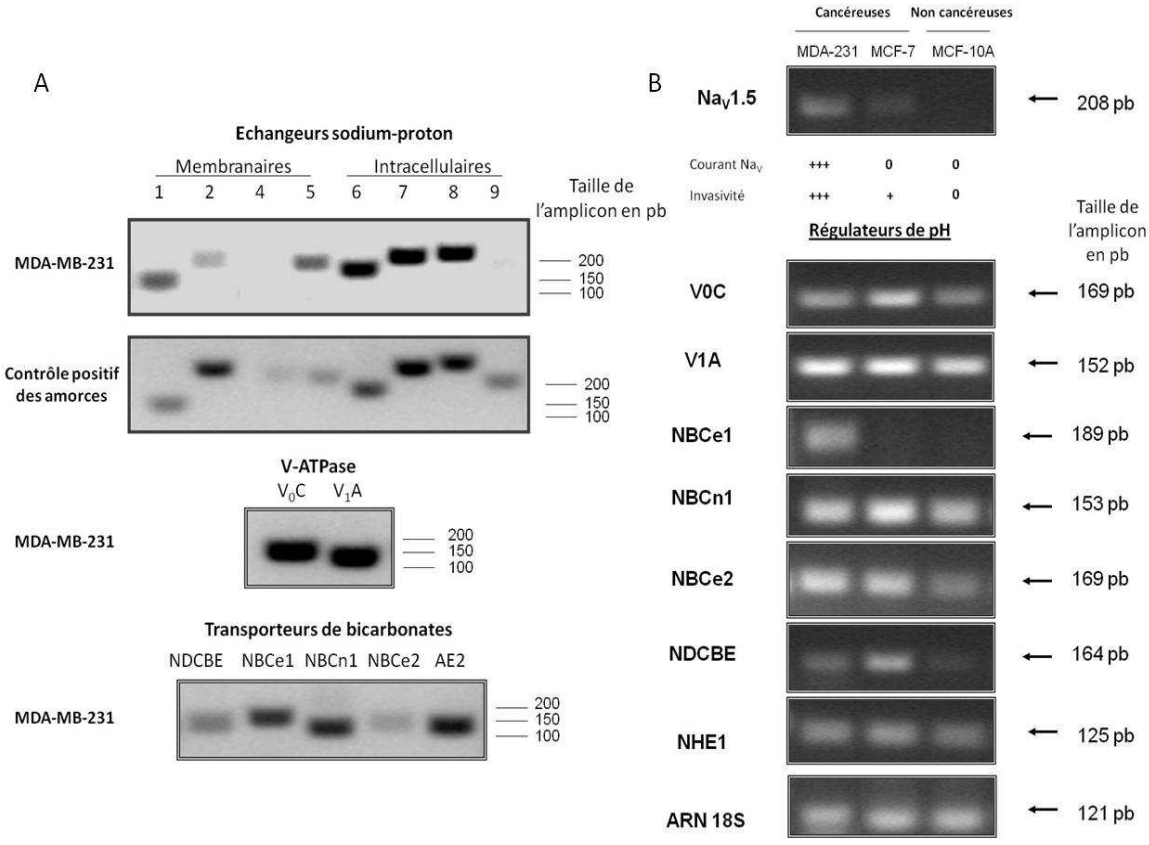


Figure 28 : Expression transcriptionnelle de plusieurs régulateurs du pH dans des lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses ou non cancéreuses.

A. Expression des ARNm des isoformes de NHE, de deux sous-unités de la V-ATPase et de transporteurs de bicarbonates dans les cellules MDA-MB-231 étudiée par RT-PCR conventionnelle. B. ARNm de régulateurs de pH dans deux lignées de cellules cancéreuses (MDA-MB-231 et MCF-7) et une lignée de cellules non cancéreuses MCF-10A. n=2

Les cellules de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 expriment les ARNm de différentes isoformes d'échangeurs sodium-proton (NHE) : NHE1, NHE2, NHE5, NHE6, NHE7 et NHE8. La présence d'ARNm codant pour NHE3 n'a pas pu être testée par faute d'amorces utilisables. Ces cellules expriment deux sous-unités de la V-ATPase, l'une située sur le domaine V0, V0c et l'autre sur le domaine V1, V1A. Elles expriment également plusieurs transporteurs de bicarbonates, l'échangeur Cl^-/HCO_3^- AE2, les co-transporteurs

Na^+/HCO_3^- NBCn1, NBCe1 et NBCe2 et l'échangeur Cl^-/ HCO_3^- dépendant du sodium NDCBE (Figure 28). L'expression de ces régulateurs de pH exprimés dans les cellules MDA-MB-231 possédant un canal $Na_V1.5$ fonctionnel a été comparée à des lignées de cellules épithéliales mammaires n'exprimant pas ce canal : une lignée de cellules cancéreuses mammaires plus faiblement invasives (MCF-7) et une lignée de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses (MCF-10A). Les ARNm de NHE1 sont exprimés dans les trois lignées étudiées : aussi bien dans les cellules non cancéreuses (MCF-10A) que dans les lignées de cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-231). Le seul régulateur de pH différemment exprimé dans ces lignées est NBCe1 qui n'est pas retrouvé dans les lignées faiblement invasives ou non cancéreuses n'exprimant pas le canal $Na_V1.5$ (Figure 28). Il est à noter que la lignée de cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives MCF-7 exprime des ARNm de $Na_V1.5$ mais cette expression n'est pas responsable de l'expression de courants fonctionnels.

Les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231 exprimant les ARNm de nombreux régulateurs de pH, il est nécessaire d'étudier leur fonctionnalité et leur importance sur la régulation du pH_i. L'étude de la fonctionnalité de ces protéines a pu être effectuée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de siRNA spécifiques dans le but de déterminer leurs rôles dans la régulation du pH et des propriétés de prolifération, de migration et d'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Un siRNA spécifique de NHE1 a été utilisé afin de déterminer le rôle de cet échangeur dans la régulation du pH_i des cellules MDA-MB-231. Pour son utilisation, une cinétique a permis de déterminer le temps optimal nécessaire à une bonne efficacité de l'inhibition de l'expression de NHE1 par son siRNA. Un western blot a été réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules MDA-MB-231 cultivées pendant 24, 48 et 72h après transfection avec 10 nM de siRNA dirigé contre les ARNm de NHE1 (Figure 29). Dès 24h après la transfection, la bande correspondant à NHE1 située à environ 90 kDa est moins exprimée dans les cellules traitées par le siNHE1 que dans les cellules contrôles. L'effet est maximal à 48 et 72h. Un temps de 48h après transfection a été choisi, permettant une réduction de l'expression des ARNm de NHE1 d'environ 60 % (Figure 29). Afin de s'affranchir d'un effet toxique de l'inhibiteur pharmacologique des NHEs, l'EIPA (5-N-ethyl-N-isopropyl amiloride), une gamme de concentration a été réalisée pour déterminer la concentration à utiliser. L'EIPA ne présente pas de toxicité pendant 24h sur les cellules MDA-MB-231 lorsqu'il est utilisé à une concentration de 1 µM mais présente une légère toxicité lorsque la concentration est

supérieure ou égale à 3 µM (Figure 29). Une concentration de 1 µM a donc été utilisée pour les mesures nécessitant des cultures de 24h ou plus en présence de l'inhibiteur et une concentration de 10 µM pour un traitement extemporané lors des mesures de pH. Le rôle de la V-ATPase dans la migration et l'invasivité cellulaire n'a pu être étudié puisque l'inhibiteur bafilomycine A1 induit une diminution de la viabilité cellulaire dès 24h de traitement (évaluée par un test MTT et confirmée par une coloration au bleu de méthylène). Cet effet a également été observé sur des cellules de cancer du colon, où la bafilomycine induit une diminution de la viabilité cellulaire dès 12 h de traitement et augmente l'apoptose (Wu *et al.*, 2009).

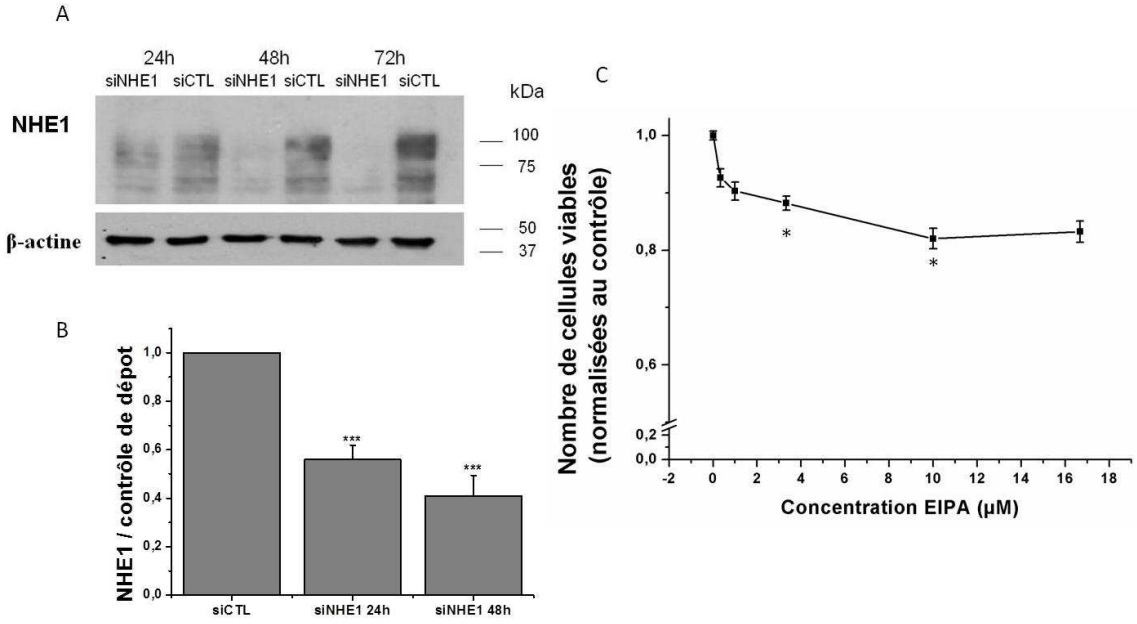


Figure 29 : Efficacité du siRNA dirigé contre NHE1 et toxicité de l'EIPA.

A. Western blot représentatif de l'efficacité du siRNA spécifique de NHE1. B. Quantification de l'inhibition de l'expression de NHE1 par son siRNA spécifique. Les résultats sont normalisés par rapport à un contrôle de dépôt et au siCTL *** $P < 0{,}001$ par rapport au siCTL (n=6 pour 24h et n=4 pour 48h) C. Toxicité de l'EIPA évaluée par un test MTT. * $P < 0{,}05$ par rapport à la condition contrôle (n=3, 4 puits par condition).

L'échangeur sodium-proton NHE1 est une protéine régulatrice du pH dont l'expression est ubiquitaire. Dans les cellules cancéreuses, NHE1 est connue pour avoir une expression augmentée ou une activité accrue et participer à la régulation du pH (Gatenby *et al.*, 2007; Reshkin *et al.*, 2000b; Rotin *et al.*, 1989). Cet échangeur est impliqué dans la prolifération, la migration et l'invasivité des cellules cancéreuses (Horvat *et al.*, 1992; Reshkin *et al.*, 2000a; Stock *et al.*, 2005). Afin de déterminer son rôle dans l'invasivité induite par l'activité du canal $Na_V1.5$, une caractérisation plus générale du rôle de NHE1 dans différentes propriétés des

cellules MDA-MB-231 a été effectuée. Le siRNA dirigé contre les ARNm de NHE1 a permis l'étude de l'implication de cette protéine dans la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231. Des cellules dont l'expression de NHE1 a été réduite par un siRNA dirigé contre ses ARNm ont été mises en culture pendant 4 jours puis la viabilité cellulaire a été mesurée toutes les 24h par un test MTT. Après 24h de culture, le nombre de cellules viables n'est pas différent dans les cellules siNHE1 par rapport aux cellules traitées avec un siCTL, en revanche, à partir de 48h et pour des temps plus longs la viabilité est significativement diminuée par le siNHE1, pour atteindre 40 % de diminution de viabilité 4 jours après transfection (Figure 30). Afin de s'affranchir d'un effet de l'inhibition de NHE1 sur le métabolisme mitochondrial sur lequel est basé le test MTT, ces résultats ont été confirmés par une coloration des cellules au bleu de méthylène (Figure 30).

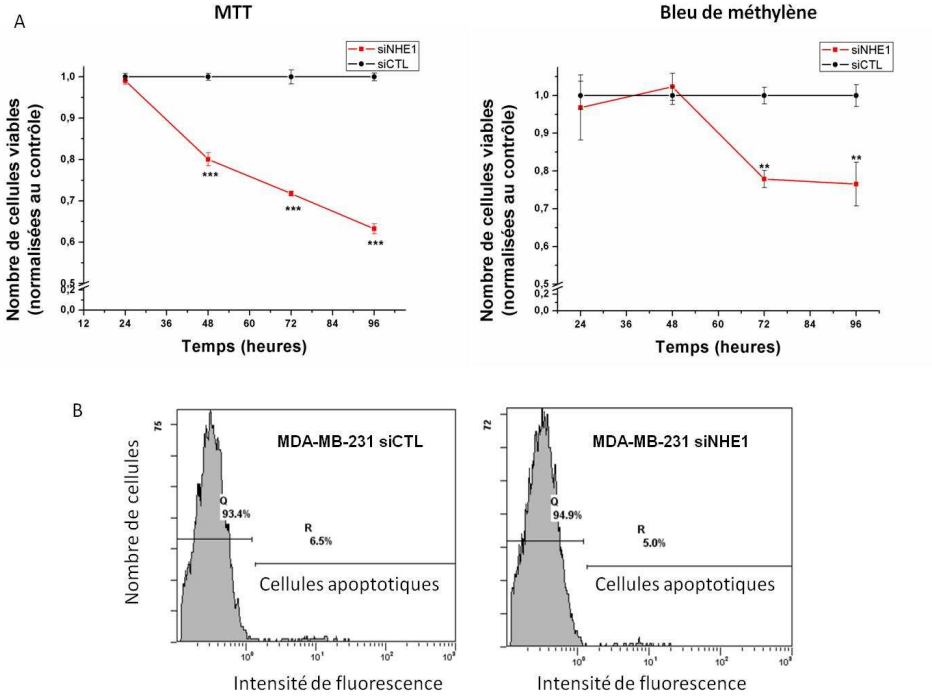


Figure 30 : Effet de l'inhibition de l'expression de NHE1 par un siRNA spécifique (siNHE1) sur la viabilité cellulaire et l'apoptose.

A. La viabilité cellulaire est évaluée par un test MTT (n = 4) ou par une coloration des cellules au bleu de méthylène (n=2) 3 à 6 puits par condition. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ par rapport au siCTL. B. Les cellules apoptotiques sont détectées à l'aide de l'anticorps F7-26. Le pourcentage de cellules marquées n'est pas modifié par le siNHE1 (n=2).

Une diminution de la viabilité cellulaire peut être la conséquence d'une augmentation de l'apoptose. Les cellules apoptotiques ont été marquées avec l'anticorps F7-26, spécifique des cellules apoptotiques, puis détectées en cytométrie en flux. Le nombre de cellules

apoptotiques n'est pas augmenté pour des cellules transfectées par un siRNA dirigé contre les ARNm de NHE1 par rapport à un siRNA contrôle (9,85 % ± 3,35 de cellules apoptotiques pour les cellules siCTL et 4,1 % ± 0,9 pour les cellules siNHE1 n=2). Ces résultats suggèrent d'une part que NHE1 semble actif dans les cellules MDA-MB-231 puisqu'il participe à la régulation de la prolifération cellulaire et que la réduction de viabilité cellulaire observée lors de son inhibition ne met pas en jeu de phénomène apoptotique. Le rôle de NHE1 dans la prolifération des cellules MDA-MB-231, pourrait impliquer une augmentation de la transition de la phase G2 du cycle cellulaire vers la phase M comme il a été proposé dans des fibroblastes (Putney and Barber, 2003).

Le rôle de NHE1 dans la migration des cellules MDA-MB-231 a également été évalué par la mesure du nombre de cellules capables de traverser un filtre poreux. L'inhibition de NHE1 par un inhibiteur pharmacologique, l'EIPA ou par un siRNA spécifique réduit d'environ 30 % la migration cellulaire (Figure 31). De plus, l'EIPA n'a pas d'effet additif sur l'effet du siNHE1 suggérant que seule ou très majoritairement l'isoforme NHE1 est impliquée dans la migration cellulaire. Par ailleurs, comme retrouvé précédemment dans l'équipe (Gillet *et al*., 2009; Roger *et al*., 2003) et contrairement aux données du laboratoire de M. Djamgoz (Fraser *et al*., 2005), l'inhibition du canal $Na_V1.5$ par son inhibiteur pharmacologique la tétrodotoxine (TTX) ou par un siRNA n'a pas d'effet significatif sur la migration cellulaire. L'inhibition simultanée de NHE1 et $Na_V1.5$ n'induit pas de diminution supplémentaire de la migration cellulaire par rapport à l'inhibition de NHE1 seule (Figure 31).

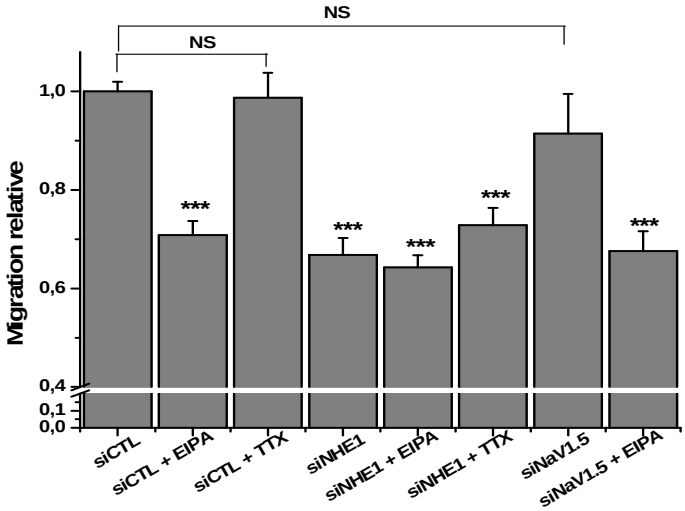


Figure 31 : Rôle de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans la migration cellulaire.

La migration cellulaire a été évaluée par le passage des cellules à travers une membrane poreuse (8µm de diamètre). Un gradient de SVF est utilisé comme chimioattractant. Les cellules sont transfectées avec les siRNA

puis 24h après sont ensemencées sur les puits de migration en présence ou non d'EIPA à 1 µM ou de 30 µM de TTX. n= 3 à 5 expériences indépendantes avec 3 inserts par condition. *** $P < 0,001$ par rapport au siCTL.

Ces résultats préliminaires à l'étude de la régulation du pH des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 indiquent que plusieurs régulateurs du pH sont exprimés dans ces cellules. Parmi ces différents régulateurs de pH, l'échangeur sodium-proton NHE1, connu pour réguler le pH de nombreuses cellules cancéreuses favorise la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Il pourrait donc être impliqué dans la régulation du pH de ces cellules et dans l'invasivité cellulaire. L'objectif de l'étude suivante est de déterminer si les différentes protéines régulatrices du pH identifiées comme exprimées au niveau de leurs ARNm sont fonctionnelles et participent à la régulation du pH des cellules MDA-MB-231. A partir de l'étude de la régulation du pH de ces cellules, nous avons cherché à identifier le mécanisme par lequel l'activité du canal $Na_V1.5$ permet de favoriser l'invasivité cellulaire par une acidification extracellulaire.

C. Article 1 : $Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H^+ efflux in caveolae.

Lors de cette étude, la régulation du pH des cellules MDA-MB-231 a été analysée afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'acidification extracellulaire induite par l'activité du canal $Na_V1.5$ favorisant l'invasivité cellulaire. Ces résultats ont été publiés en 2011.

$Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H^+ efflux in caveolae.

BRISSON L., GILLET L., CALAGHAN S., BESSON P., LE GUENNEC J.-Y., ROGER S. & GORÉ J. 2011.

Oncogene. *2011 Apr 28;30(17):2070-6. Epub 2010 Dec 20*

Oncogene (2010) 1–7
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10
www.nature.com/onc

SHORT COMMUNICATION

$Na_V1.5$ enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H^+ efflux in caveolae

L Brisson[1], L Gillet[1], S Calaghan[2], P Besson[1], J-Y Le Guennec[3], S Roger[1,4] and J Gore[1,4]

[1]*Inserm U921, Nutrition, Croissance et Cancer, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, Tours, France;* [2]*Institute of systems and membrane biology, University of Leeds, Leeds, UK and* [3]*Inserm U637 Physiopathologie cardiovasculaire, Université Montpellier-2, Montpellier Cedex, France*

$Na_V1.5$ sodium channels enhance the invasiveness of breast cancer cells through the acidic-dependent activation of cysteine cathepsins. Here, we showed that the Na^+/H^+ exchanger type 1 (NHE1) was an important regulator of H^+ efflux in breast cancer cells MDA-MB-231 and that its activity was increased by $Na_V1.5$. $Na_V1.5$ and NHE1 were colocalized in membrane rafts containing caveolin-1. The inhibition of $Na_V1.5$ or NHE1 induced a similar reduction in cell invasiveness and extracellular matrix degradation; no additive effect was observed when they were simultaneously inhibited. Our study suggests that $Na_V1.5$ and NHE1 are functionally coupled and enhance the invasiveness of cancer cells by increasing H^+ efflux.
Oncogene advance online publication, 20 December 2010; doi:10.1038/onc.2010.574

Keywords: cancer; caveolae; invasion; Na^+/H^+ exchanger; voltage-gated sodium channels

Introduction

Breast cancer is the primary cause of death in women worldwide mostly as a consequence of the appearance of metastases (Parkin *et al*., 2005). The development of metastases consists of a complex series of events. One key step is the acquisition by cancer cells of an invasive potency, mainly relying on the capacity to degrade basement membranes and extracellular matrices (Gupta and Massague, 2006) by various proteases such as matrix metalloproteinases (Egeblad and Werb, 2002) or cysteine cathepsines (Mohamed and Sloane, 2006). We and others have shown that voltage-gated sodium channels (Na_V) are abnormally expressed in cancer cells of epithelial origin and associated with cancer progression (Laniado *et al*., 1997; Roger *et al*., 2003, 2006, 2007; Fraser *et al*., 2005; Diaz *et al*., 2007). In the highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cell line, $Na_V1.5$ activity enhances extracellular matrix invasion by increasing the activity of acidic cysteine cathepsins B and S through an acidification of the pericellular microenvironment (Gillet *et al*., 2009). In this study, we investigated the potential pH regulators involved in the Na_V-dependent invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. We found that the Na^+/H^+ exchanger type 1 (NHE1) is the central regulator of intracellular pH and that its activity is enhanced by the function of $Na_V1.5$. These two proteins were colocalized in the membrane fractions, which contain caveolae.

Correspondence: Dr S Roger, Inserm U921, Nutrition, Croissance et Cancer, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, Tours, Region center 37032, France.
E-mail: sebastien.roger@univ-tours.fr
[4]These authors contributed equally to this work.
Received 29 July 2010; revised 11 October 2010; accepted 15 November 2010

Results and discussion

In a recent study in highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cells, we have shown that $Na_V1.5$ activity is responsible for the enhancement of extracellular matrix invasion through perimembrane acidification, which consequently promotes the activity of acidic cathepsins (Gillet *et al*., 2009). To determine the pH regulators that are involved in this phenomenon, we first analyzed the effect of various inhibitors and solutions on H^+ efflux. Proton effluxes were assessed in MDA-MB-231 cells that were acidified by NH_4Cl pulse-wash then resuspended in a sodium free solution. The subsequent addition of 130 mM NaCl generated H^+ effluxes and was used as a control condition. The NHEs inhibitor EIPA reduced H^+ efflux by ~90% whereas the V-ATPase inhibitor bafilomycin had no effect (Figures 1a and b). Resuspending the cells in Na_2SO_4 showed no difference compared with NaCl (Figure 1c). These results indicate that H^+ efflux was dependent on Na^+ and not on Cl^-. This was further demonstrated in absence of sodium (no addition of NaCl, or substitution by Choline Cl or *N*-methyl-D-glucamine). Bicarbonates were ineffective in regulating H^+ efflux in these conditions. This was confirmed by the use of 4,4′-diisothiocyanato-stilbene-2,2′-disulfonic acid, an inhibitor of anionic exchangers (Figure 1c). Taken together these results indicate a prominent role for NHE in controlling H^+ efflux. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of EIPA on H^+ efflux was $0.11 \pm 0.02\,\mu M$ (Supplementary Figure 1B). We tested the effect of small interfering RNA (siRNA) directed against NHE1 mRNA (Figure 1d, Supplementary Figure 1B). Silencing NHE1 led to a 60% reduction of

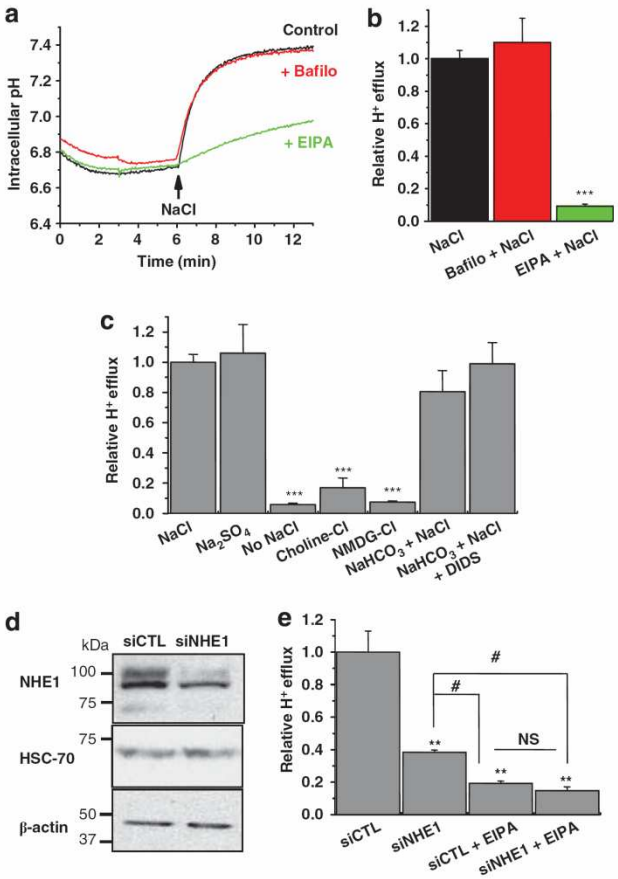


Figure 1 NHE1 controls H^+ efflux in MDA-MB-231 breast cancer cells. (**a**) Representative intracellular pH evolution in NH_4Cl-acidified cells resuspended in 130 mM NaCl (NaCl) in presence of 100 nM bafilomycin (Bafilo), 10 µM EIPA or not (control). (**b**) Relative H^+ efflux measurements after resuspending cells in the same conditions as in **a**. (**c**) Relative H^+ efflux measurements after NH_4Cl-induced intracellular acidification and resuspension in different extracellular solutions containing: 130 mM NaCl (NaCl); 65 mM Na_2SO_4; 130 mM Choline-Cl (Choline Cl); 130 mM *N*-methyl-D-glucamine (NMDG-Cl); 20 mM $NaHCO_3$ + 110 mM NaCl in presence or not of 100 µM 4,4′-diisothiocyanato-stilbene-2,2′-disulfonic acid (DIDS) ($n=2$–12). (**d**) Representative western blots showing NHE1, HSC-70 and β-actin from MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCTL) or with siRNA specific for NHE1 (siNHE1) ($n=4$). (**e**) Relative H^+ efflux from cells transfected with siCTL or with siNHE1, in presence of 10 µM EIPA or not ($n=4$). $^{***}P<0.001$ versus control condition; $^{**}P<0.01$ versus control condition; $^{\#}P<0.05$ versus siNHE1.

H^+ efflux compared with the control condition (siCTL, Figure 1e). EIPA induced a small, but significant additional reduction in H^+ efflux. We analyzed NHE1 and voltage-gated sodium channel Na$_V$1.5 mRNA expression in non-cancer human breast epithelial cells MCF-10A, and in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells (Figure 2a). All cell lines expressed mRNA for NHE1 at comparable levels. As previously reported (Fraser *et al*., 2005; Gillet *et al*., 2009) the highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cell line expresses high levels of mRNA for Na$_V$1.5, whereas the poorly invasive MCF-7 cell line showed a weak expression and the non-cancer cell line MCF-10A showed no expression at all. In line with these findings, only MDA-MB-231 cells exhibited voltage-gated sodium currents (Figure 2b). Silencing RNA directed against Na$_V$1.5 mRNA (siNa$_V$1.5, Supplementary Figure 1C) was used to inhibit the expression of Na$_V$1.5. Figure 2c shows the specific effect on Na$_V$1.5 protein expression, with no change in NHE1 expression. Tetrodotoxin (TTX, 30 µM) and siNa$_V$1.5 abolished I_{Na}, but EIPA did not (Figure 2d). We then questioned whether the functioning of Na$_V$1.5 could modify NHE1 activity. Here, again EIPA reduced H^+ efflux in MDA-MB-231 cells by ~90%. The abolition of I_{Na}, using either TTX or siNa$_V$1.5, was responsible for a significant reduction of H^+ efflux. Furthermore, TTX did not induce a supplementary reduction in H^+ efflux when coapplied with EIPA (Figure 2e). This indicated that Na$_V$1.5 could promote H^+ efflux through NHE. Conversely, TTX had no effect in regulating H^+ efflux from MCF-7 cells (Figure 2f), which are devoid of I_{Na} (Figure 2b).

Silencing NHE1 had no effect on the Na$_V$1.5 current-voltage relationship (Supplementary Figure 1E) and did not modify the window of voltage of I_{Na} (Supplmentary Figure 1F). This window of voltage is thought to regulate cell invasiveness because it encompasses the membrane potential of the cells, at which Na$_V$1.5 is active and thus allows a persistent sodium entry (Roger *et al*., 2003; Gillet *et al*., 2009). The inhibition of either NHE1, by the use of siNHE1 or EIPA, or Na$_V$1.5, by siNa$_V$1.5 or TTX, produced the same reduction of cell invasiveness by nearly 35% (Figure 3a). Importantly, the coinhibition of NHE1 and Na$_V$1.5 with either siNHE1 plus TTX or siNa$_V$1.5 plus EIPA had no supplementary effect. Experiments were then performed to understand how Na$_V$1.5 and NHE1 influenced the matrix degradation. To do so, we used DQ-gelatin, which releases fluorescent products after proteolytic cleavage by gelatinases, in a three-dimensional matrix of Matrigel (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France). The gelatinolytic activity was mainly distributed at the pericellular zone of cancer cells (Figure 3b). Culture with TTX reduced gelatinolysis of the pericellular matrix (~63% reduction in fluorescence intensity) to the same extent as previously reported (Gillet *et al*., 2009), confirming the regulatory role of Na$_V$1.5 in extracellular gelatinolysis (Figures 3b and c). The use of EIPA reduced matrix degradation to the same extent as the use of TTX, and the simultaneous application of TTX and EIPA induced no supplementary effect. This absence of additive effect on cell invasiveness and on gelatinolytic activity, when NHE1 and Na$_V$1.5 were simultaneously inhibited suggests that they are both involved in the same pH-dependent invasiveness regulatory pathway. We then explored their cellular localization. NHE1 and Na$_V$1.5 were found to colocalize in the plasma membrane of cancer cells grown on Matrigel (Figure 4a). We also conducted membrane fractionations by ultracentrifugation on sucrose gradient and found that both NHE1 and Na$_V$1.5 were located in caveolin-1-containing lipid rafts (Figure 4b).

Na$_V$1.5 channels have been found in the highly metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells and in

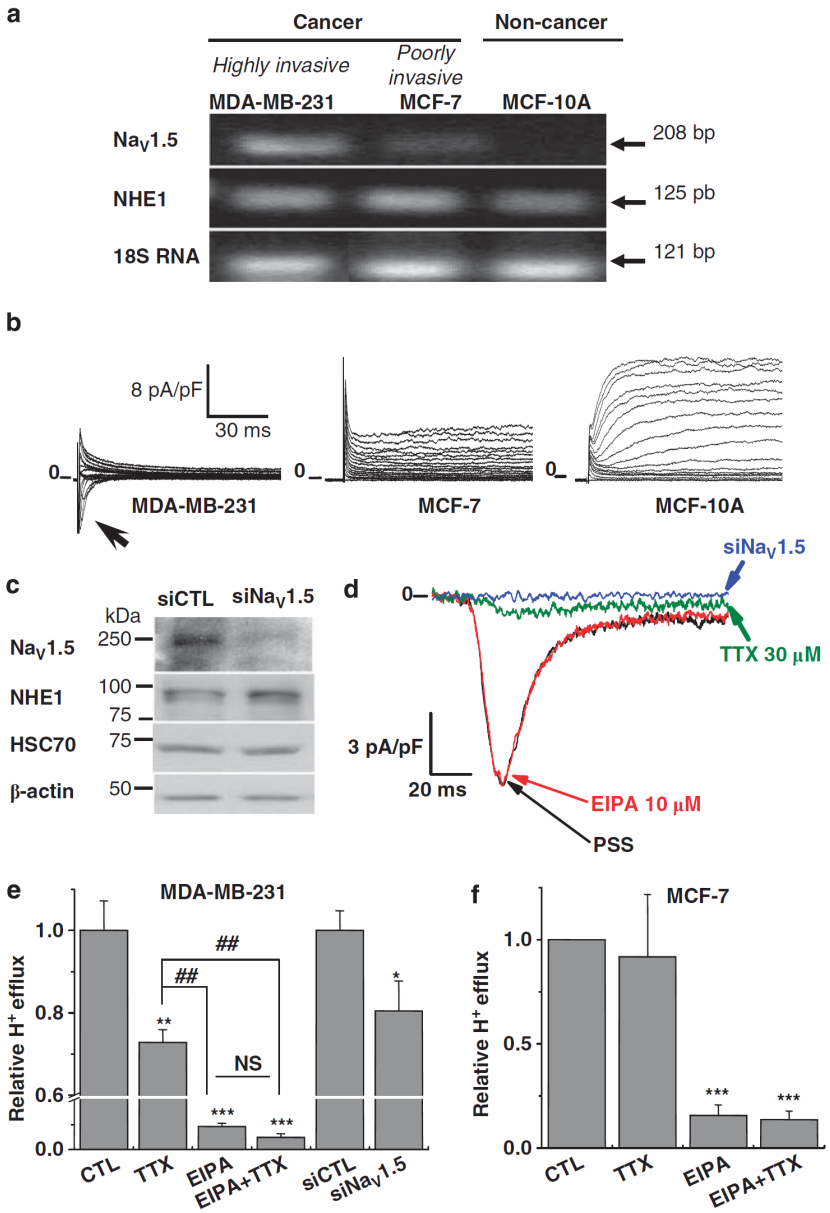


Figure 2 $Na_V1.5$ activity enhances H^+ efflux and invasiveness of breast cancer cells. (**a**) RT–PCR experiments showing the mRNA expression of $Na_V1.5$, NHE1 and 18S RNA in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, and MCF-10A non-cancer cells ($n=2$). (**b**) Representative current-voltage protocols, obtained from the same cell lines as in **a**, from a holding potential of −70 mV to +90 mV, with 10 mV increments. The arrow indicates the voltage-gated sodium current. (**c**) Representative western blots of $Na_V1.5$, NHE1, HSC-70 and β-actin performed on MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCTL) or with siRNA specific for $Na_V1.5$ ($siNa_V1.5$) ($n=4$). (**d**) Representative sodium currents recorded from a holding potential of −100 to −5 mV in physiological saline solution (PSS), or in presence of EIPA (10 µM), TTX (30 µM) or when cells were transfected with $siNa_V1.5$. (**e**) Relative H^+ efflux, calculated using the BCECF probe, after NH_4Cl-induced intracellular acidification, from MDA-MB-231 cells transfected with siCTL or with $siNa_V1.5$, in presence of 30 µM TTX, 10 µM EIPA or not (CTL) ($n=9$–11). (**f**) Relative H^+ efflux from MCF-7 cells in presence of 30 µM TTX and/or 10 µM EIPA or none (CTL) ($n=3$). $^{***}P<0.001$ versus control condition; $^{**}P<0.01$ versus control condition; $^{\#\#}P<0.01$ versus TTX.

high grade breast cancer biopsies, but not in non-cancer or low-grade cancer biopsies (Roger *et al*., 2003; Fraser *et al*., 2005). These channels have been associated with the invasive properties of cancer cells by enhancing the activity of extracellular cysteine cathepsins B and S, through a pericellular acidification (Gillet *et al*., 2009). The importance of an acidic tumor microenvironment for cancer cell invasiveness and malignant progression is well established (Kraus and Wolf, 1996; Martinez-Zaguilan *et al*., 1996; Moellering *et al*., 2008). The activation of acidic gelatinolytic cathepsins, mainly cathepsin B, is known to be critical in these effects (Rozhin *et al*., 1994; Bourguignon *et al*., 2004; Giusti *et al*., 2008). Among all pH regulators, the ubiquitous Na^+/H^+ exchanger NHE1 has drawn substantial attention in the field of cancer research, allowing cancer

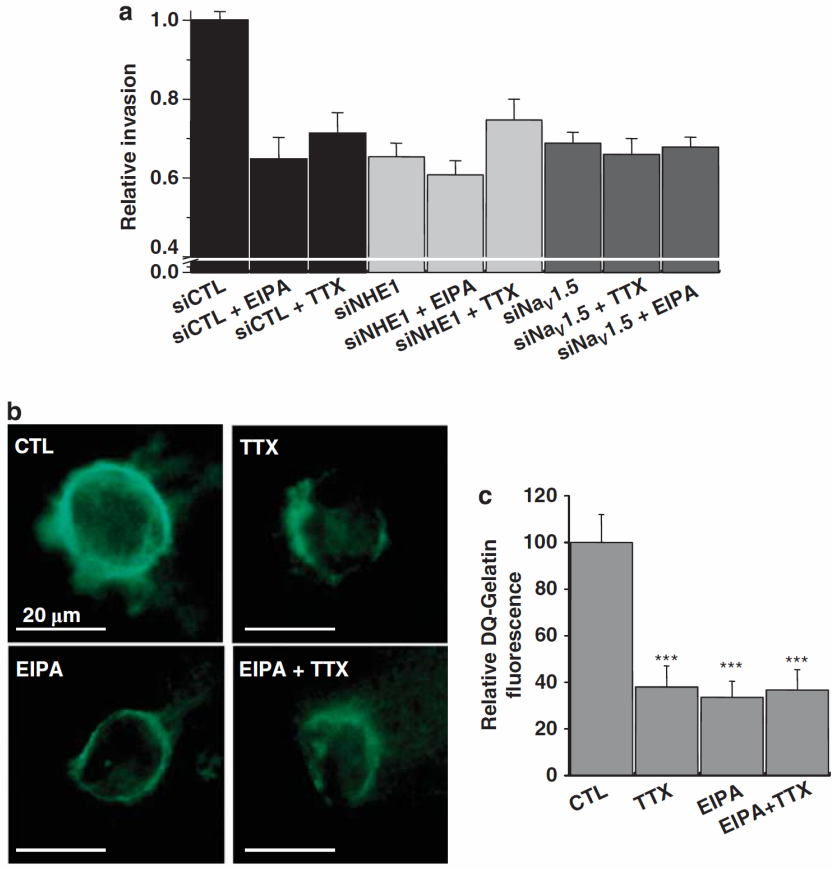


Figure 3 Na$_V$1.5 enhances cancer cell invasiveness through the regulation of NHE1 function. (**a**) Relative matrix invasion by MDA-MB-231 breast cancer cells transfected with siCTL, siNa$_V$1.5 or siNHE1 in presence or absence of EIPA (1 µM) or TTX (30 µM) ($n=4$). All conditions tested were statistically different from siCTL condition at $P<0.001$, but there was no significant difference between treatments. (**b**) Fluorescence imaging of cells grown for 24 h within a 3D Matrigel matrix containing DQ-Gelatin in control conditions (CTL), in presence of 30 µM TTX (TTX), 1 µM EIPA (EIPA) or a combination of both (EIPA + TTX). (**c**) Quantification of fluorescence intensity from DQ-gelatin cleavage expressed as a percentage of the control condition ($n=11$–17). ***$P<0.001$ versus control condition.

cells to adapt to their high metabolic H^+ production (Gatenby *et al*., 2007). Indeed it has been shown to have a predominant role in extracellular acidification of tumor cells (Bourguignon *et al*., 2004) and also to be involved in their invasive process (Cardone *et al*., 2005; Stock and Schwab, 2009; Busco *et al*., 2010). In this study, we showed for the first time the evidence that Na$_V$1.5 channels, abnormally expressed in breast cancer cells, functionally interact with NHE1 in caveolae to enhance its H^+-efflux activity and consequently promote acidic-dependent invasion of the extracellular matrix. Caveolae have been shown to contain NHE1 in other types of cells (Tekpli *et al*., 2008) and, independently, to be involved in breast cancer cell invasiveness (Yamaguchi *et al*., 2009). Recently, it has been shown that NHE1 is localized in invadopodia where it is responsible for an extracellular acidification and the degradation of the extracellular matrix (Busco *et al*., 2010). Our study brings a new mechanistic explanation for caveolae involvement in cancer cell invasiveness. It demonstrates for the first time that Na$_V$1.5 channels and NHE1 antiporters are partners in cancer cell invasiveness, which might primarily occur after acidic proteases-dependent matrix proteolysis on the extracellular side of caveolae. The relationship between these proteins and the dynamics of their interactions could be even more critical in membrane areas directly involved in matrix degradation such as invadopodia.

Materials and methods

Inhibitors and chemicals

TTX was purchased from Latoxan (Valence, France) and was prepared in pH-buffered physiological saline solution at pH 7.4. Fluorescent probes and antibodies were purchased from Invitrogen (Illkirch, France). 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amilorride (EIPA) and other drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (st-quentin-fallavier, France).

Cell culture

Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum. The normal mammary epithelial cell line MCF-10A was cultured in Dulbecco's

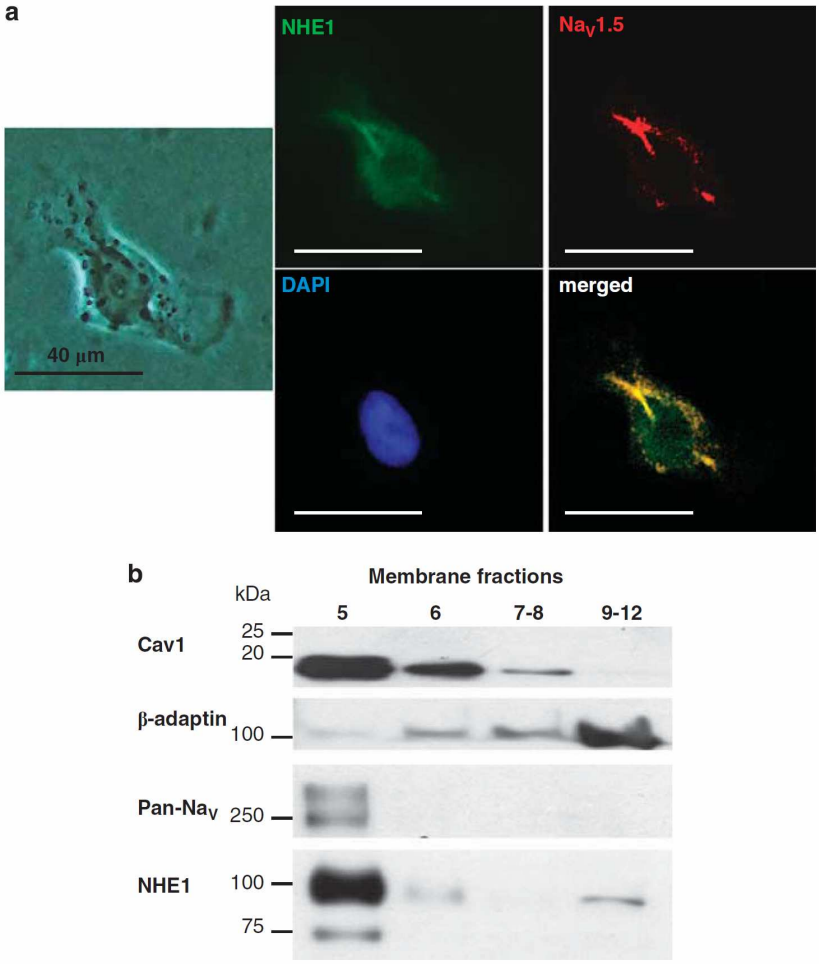


Figure 4 $Na_V1.5$ and NHE1 colocalize in caveolin-rich membrane rafts. (**a**) Representative immunofluorescence staining performed on a MDA-MB-231 cell cultured on Matrigel, using primary antibodies specific for NHE1 or $Na_V1.5$, and DAPI for nucleus staining. (**b**) Membrane fractionation on a sucrose gradient shows that NHE1 and Na_V channels are colocalized in buoyant fraction number 5. This fraction represents caveolae-containing membranes as shown by enrichment in Caveolin-1 (Cav1). β-adaptin was used as a marker of non-raft fractions.

modified Eagle's medium/Ham's F-12, 1:1 mix containing 5% horse serum, insulin (10 µg/ml), epidermal growth factor (20 ng/ml), hydrocortisone (0.5 µg/ml) and 100 ng/ml cholera toxin. Cells were grown at 37 °C in a humidified 5% CO_2 incubator.

Cell line RNA extraction, reverse transcription and PCR
Total RNA were extracted using RNAgents Total RNA Isolation System (Promega, Charbonniéres les bains, France), then reverse-transcribed with a RT kit in presence of random hexamers $pd(N)_6$ 5′-Phosphate (GE Healthcare, Velizy, France). Quantitative (real time) PCR experiments were performed in triplicate as already described (Gillet *et al*., 2009). Alternatively, PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel containing ethidium bromide, and visualized by UV trans-illumination (Gel Doc 2000 system, Bio Rad, Hercules, CA, USA).

SiRNA transfection protocol
Cells were transfected using Lipofectamine RNAi max (Invitrogen) with 20 nM siRNA directed against SCN5A mRNA ($siNa_V1.5$), and 10 nM against NHE1 mRNA (siNHE1) or scramble siRNA-A as a control (siCTL), all purchased from Tebu-Bio (Perray en Yvelines, France).

Electrophysiology
Patch pipettes were pulled from borosilicate glass to a resistance of 4–6 MΩ. Currents were recorded, in whole-cell configuration, under voltage-clamp mode at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument, Foster City, CA, USA). Cell capacitance and series resistance were electronically compensated by about 60%. Na^+ currents (I_{Na}) were studied as already described (Gillet *et al*., 2009) and amplitudes were expressed as current density (pA/pF). The physiological saline solution had the following composition (in mM): NaCl 140, KCl 4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, D-Glucose 11.1 and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 10, adjusted to pH 7.4. The intrapipette solution had the following composition (in mM): K-Glutamate 125, KCl 20, $CaCl_2$ 0.37, $MgCl_2$ 1, Mg-ATP 1, EGTA 1 and HEPES 10, adjusted to pH 7.2.

Migration and in vitro *invasion assay*
Cell migration and invasiveness were analyzed as previously described (Gillet *et al*., 2009) in 24-well plates receiving cell

culture inserts with polyethylene terephtalate membranes of 8 μm pore size, free (migration) or covered (invasion) with a film of Matrigel. For easier comparison, results obtained for migration and invasion were normalized to the control condition.

Measurement of intracellular pH
Cells were incubated for 30 min at 37 °C in Hank's medium containing 2 μM BCECF-AM (2′,7′-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein; excitation 503/440 nm; emission 530 nm). Excess dye was removed by rinsing the cells twice with physiological saline solution. H^+ efflux was measured as previously described (Gore *et al*., 1994).

Membrane fractionation
Membranes were fractionated as described (Calaghan *et al*., 2008) after extraction in 500 mM Na_2CO_3 (pH 11) containing 0.5 mM EDTA and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cells were scrapped then sonicated. A volume of 2 ml homogenate were mixed with an equal volume of 90% sucrose in 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-buffered saline solution (25 mM MES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5) to form a 45% sucrose solution. A discontinuous sucrose gradient was created by layering onto this a further 4 ml each of 35 and 5% sucrose solutions (MES-buffered saline with 250 mM Na_2CO_3). Gradients were centrifuged for 17 h at 280 000 × g at 4 °C, after which a total of 12 fractions (1 ml each) were collected. Caveolin 1 (Cav1) was used as a marker for the identification of caveolae fractions, and β-adaptin was used as a marker for non-lipid raft fractions. Both markers were measured by western blotting following SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. Equal volumes of fractions were loaded onto the gel.

Western blots
Cells were lysed in presence of 5% SDS and protease inhibitors in phosphate-buffered saline (PBS). Protein samples were prepared under reducing conditions, separated according to standard SDS–polyacrylamide gel electrophoresis protocols on polyacrylamide gels (Laemmli, 1970), then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Primary antibodies used were: mouse anti-NHE1 (1/1500, Chemicon International, Millipore, Billerica, MA, USA), mouse anti-HSC70 (1/30 000, Tebu-Bio), rabbit anti-caveolin 1 (1/1000, BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), rabbit anti-β-adaptin (1/2500, BD Biosciences) and rabbit anti-human $Na_V1.5$ (1/200) generated as previously described (Xu *et al*., 2005) or mouse $PanNa_V$ antibodies (1/200, Sigma-Aldrich). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies were: goat anti-mouse (1/3000, Tebu-Bio), goat anti-rabbit (1/5000, Tebu-Bio) and rabbit anti-β-actin-HRP (1/1000, Tebu-Bio). Densitometric analyses were performed using QuantityOne software v4.6.3 (BioRad).

Immunofluorescence experiments
Cells were cultured for 24 h on glass coverslips covered with Matrigel, then fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized for 3 min in 0.1% triton-X-100 in PBS at room temperature. Unspecific sites were saturated by incubating 20 min with 3% bovine serum albumin in PBS. Human $Na_V1.5$ channels were detected by incubating cells overnight with anti-$Na_V1.5$ (1/70) in PBS containing 1% bovine serum albumin. NHE1 were detected using a goat anti-NHE1 (1/100). Cells were washed three times in PBS and incubated for 60 min with an anti-rabbit TexasRed (1/800) for $Na_V1.5$ and an anti-goat AlexaFluor488 secondary antibody (1/10 000) for NHE1. Gelatinolytic activity was assessed by culturing cells for 24 h in a 3D Matrigel matrix containing 25 μg/ml of DQ-Gelatin (Invitrogen) as previously reported (Gillet *et al*., 2009). Epifluorescence microscopy was performed with a Nikon TI-S (Champigny-sur-Marne, France). Fluorescence density was quantified by image analysis by ImageJ software 1.38I (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analyses
Data are displayed as mean ± s.e. of the mean (n = number of cells/experiments). One-way analysis of variance on ranks followed by a Student-Newmann–Keuls test were used to compare different conditions for cell invasiveness and H^+ efflux. The t-tests were used to compare western blot and fluorescence quantifications and results from quantitative-PCR experiments. Alternatively, Mann–Whitney rank sum test was used when the variance homogeneity test failed. Statistical significance is indicated as: $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$. NS stands for not statistically different.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr Lin-Hua Jiang (University of Leeds, UK) for comments about the manuscript. We are grateful to Dr Ming Lei (University of Manchester, UK) for the generous gift of the anti-$Na_V1.5$ antibody. This work was supported by the 'Ministère de la Recherche et des Technologies' and the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (Inserm), the 'Association CANCEN' and a grant from the 'Ligue Nationale Contre le Cancer'. Lucie Brisson and Ludovic Gillet were recipients of fellowships from the 'Région Centre'.

References

Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. (2004). CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**: 26991–27007.

Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E *et al*. (2010). NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *Faseb J* **24**: 3903–3915.

Calaghan S, Kozera L, White E. (2008). Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* **45**: 88–92.

Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na+/H+ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* **5**: 786–795.

Diaz D, Delgadillo DM, Hernandez-Gallegos E, Ramirez-Dominguez ME, Hinojosa LM, Ortiz CS *et al*. (2007). Functional expression of

voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J Cell Physiol* **210**: 469–478.

Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161–174.

Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF *et al.* (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* **11**: 5381–5389.

Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB *et al.* (2007). Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* **97**: 646–653.

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P *et al.* (2009). Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* **284**: 8680–8691.

Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N *et al.* (2008). Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* **10**: 481–488.

Gore J, Besson P, Hoinard C, Bougnoux P. (1994). Na(+)-H+ antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am J Physiol* **266**: C110–C120.

Gupta GP, Massague J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**: 679–695.

Kraus M, Wolf B. (1996). Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. *Tumour Biol* **17**: 133–154.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB *et al.* (1997). Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion *in vitro*. *Am J Pathol* **150**: 1213–1221.

Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ, Hendrix MJ. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14**: 176–186.

Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M *et al.* (2008). Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* **25**: 411–425.

Mohamed MM, Sloane BF. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764–775.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74–108.

Roger S, Besson P, Le Guennec JY. (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, Le Guennec JY. (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 PI, Iochmann S *et al.* (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.

Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* **54**: 6517–6525.

Stock C, Schwab A. (2009). Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch* **458**: 981–992.

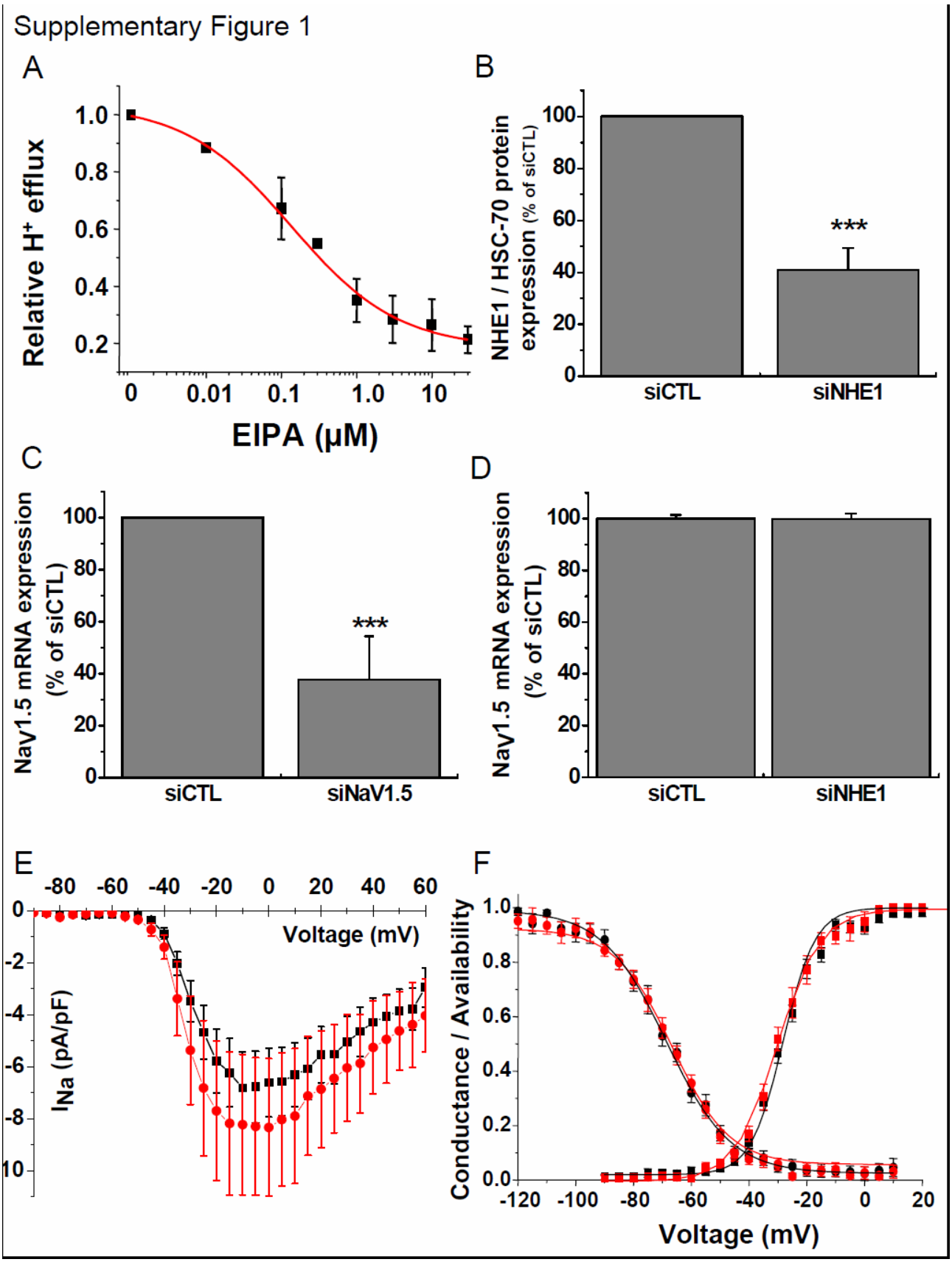
Tekpli X, Huc L, Lacroix J, Rissel M, Poet M, Noel J *et al.* (2008). Regulation of Na+/H+ exchanger 1 allosteric balance by its localization in cholesterol- and caveolin-rich membrane microdomains. *J Cell Physiol* **216**: 207–220.

Xu SZ, Zeng F, Lei M, Li J, Gao B, Xiong C *et al.* (2005). Generation of functional ion-channel tools by E3 targeting. *Nat Biotechnol* **23**: 1289–1293.

Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, 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.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure legends

Supplementary figure 1 :

A, Dose-response curve of EIPA on H^+ efflux from MDA-MB-231 calculated as explained in Methods section using the BCECF probe after NH_4Cl-induced intracellular acidification. The IC_{50} obtained from the sigmoidal fit was 0.11 ± 0.02 µM. **B**, Mean data from western blot analyses showing the NHE1 protein expression relative to HSC-70 expression from MDA-MB-231 cancer cells transfected with siRNA against NHE1 (siNHE1) *vs.* control (siCTL) (n= 4). The two bands were corresponding to the glycosylated and non-glycosylated forms were quantified as a whole. **C**, $Na_V1.5$ mRNA expression assessed by Q-PCR in MDA-MB-231 cells transfected with siRNA against $Na_V1.5$ ($siNa_V1.5$) *vs.* control (siCTL) (n= 2 experiments). **D**, $Na_V1.5$ mRNA expression assessed by Q-PCR in MDA-MB-231 cells transfected with siRNA against NHE1 (siNHE1) *vs.* control (siCTL) (n= 3). **E**, Current-voltage relationship of the sodium current obtained from a holding potential of -100 mV in PSS from MDA-MB-231 cells transfected with siNHE1 (red circles, n= 16 cells) or with siCTL (black squares, n= 13 cells). **F**, Conductance-(■) and availability-(●) voltage relationships obtained from MDA-MB-231 cells transfected with siNHE1 (red symbol, n= 16 cells) or with siCTL (black symbol, n= 13 cells). Sigmoidal fits of these relationships gives $V_{1/2}$-conductance of -27.9 ± 0.9 mV and -30.1 ± 0.2 mV for siCTL and siNHE1 respectively. $V_{1/2}$-availability were -68.0 ± 1.7 mV and -66.8 ± 1.5 mV for siCTL and siNHE1 respectively. No statistical difference was found.
Statistically different versus control condition at: ***p<0.001.

D. Résumé de l'article 1

L'utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques et siRNA a permis de démontrer que parmi plusieurs régulateurs du pH, les échangeurs sodium-proton (NHE) semblent être les principaux régulateurs du pH des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et plus particulièrement l'isoforme ubiquitaire NHE1. En présence d'un inhibiteur spécifique de $Na_V1.5$ ou d'un siRNA dirigé contre ses ARNm, l'activité d'efflux de protons de NHE1 est réduite d'environ 30 %. Par ailleurs, des mesures d'invasivité et de dégradation protéolytique ont été réalisées en réduisant l'activité de l'une ou l'autre de ces deux protéines, ou en les inhibant simultanément. L'inhibition de l'échangeur NHE1 ou du canal $Na_V1.5$ réduit l'invasivité et la dégradation protéolytique des cellules MDA-MB-231 dans une même proportion, de plus, l'inhibition simultanée de ces deux protéines n'a pas d'effet supplémentaire. Ces résultats indiquent que NHE1 et $Na_V1.5$ participent à une même voie de signalisation favorisant l'invasivité cellulaire. NHE1 pourrait être responsable de l'acidification péricellulaire induite par l'activité du canal $Na_V1.5$ et de l'augmentation d'activité protéolytique des cathepsines à cystéine B et S. Aucune modification de la quantité d'ARNm ou de protéines NHE1 n'est modifiée lorsque $Na_V1.5$ est inhibé suggérant une régulation de l'activité de NHE1 par celle du canal $Na_V1.5$ et non une régulation transcriptionnelle. NHE1 et $Na_V1.5$ semblent co-localisés dans les cellules MDA-MB-231. L'étude plus précise de la co-localisation entre NHE1 et $Na_V1.5$ démontre que ces deux protéines sont localisées dans les domaines membranaires riches en cavéoline-1. La proximité de ces deux protéines dans les radeaux lipidiques, connus pour être des plaques de signalisation pourrait permettre l'établissement d'une interaction fonctionnelle entre NHE1 et $Na_V1.5$ pour favoriser l'invasivité des cellules cancéreuses (Figure 32).

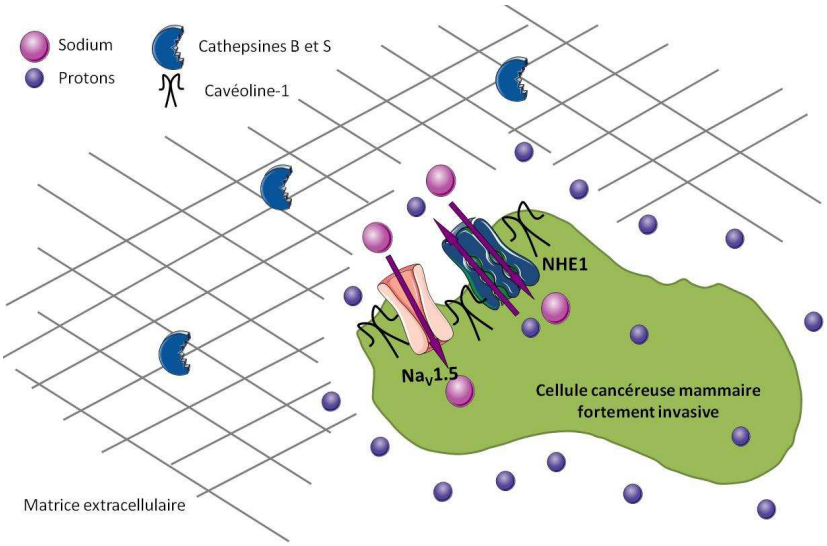


Figure 32 : Schéma proposé de la régulation de NHE1 par $Na_V1.5$ dans les domaines membranaires riches en cavéoline-1 dans les cellules cancéreuses MDA-MB-231
Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

E. Discussion

L'expression d'un canal sodique dépendant du voltage dans plusieurs types de cellules cancéreuses épithéliales est impliquée dans les phénomènes d'invasivité cellulaire *in vitro* (Roger *et al*., 2006) et proposée pour participer au développement de métastases (Fraser *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012). Les déterminants moléculaires permettant à l'activité de ce canal de favoriser l'invasivité des cellules cancéreuses sont mal compris. Les études réalisées au laboratoire ont permis de proposer un modèle dans lequel le canal sodique $Na_V1.5$ est responsable d'une entrée continue de sodium (courant de fenêtre) dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 permettant une acidification périmembranaire favorable à l'activité de protéases, les cathepsines à cystéines et donc à la dégradation de la matrice extracellulaire (Gillet *et al.*, 2009; Roger *et al.*, 2003).

La première étude réalisée au cours de cette thèse démontre que l'échangeur sodium-proton NHE1 pourrait être le lien entre l'activité du canal $Na_V1.5$ et l'invasivité cellulaire. L'étude de la régulation du pH des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 a permis de démontrer que l'échangeur sodium-proton NHE1 est un régulateur majeur du pH de ces cellules. Malgré l'expression des ARNm de deux sous-unités de la V-ATPase et de transporteurs de bicarbonates, ces régulateurs de pH ne semblent pas participer, dans nos conditions de culture et expérimentales, à la régulation du pH des cellules MDA-MB-231 (Figure 1 de l'article ci-dessus). En revanche, l'EIPA et le cariporide sont capables d'inhiber fortement l'efflux de protons des cellules MDA-MB-231 (5 µM de cariporide réduit de 85 % l'efflux de protons). Un siRNA dirigé contre les ARNm de NHE1, d'une efficacité de l'ordre de 60 % (Figure 29), réduit d'environ 60 % l'efflux de protons. Un effet additif de l'EIPA est observé pouvant s'expliquer par l'inhibition incomplète de l'expression de NHE1 par le siRNA ou par la participation minoritaire d'autres isoformes telles que les isoformes situées sur la membrane plasmique NHE2 ou NHE5 (Figure 28).

Afin de déterminer si la régulation du pH_i était différente dans des cellules possédant un courant sodique dépendant du voltage ou non, une étude comparative a été effectuée dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires. Les cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives MCF-7 n'exprimant pas le canal $Na_V1.5$ possèdent également des échangeurs sodium-proton très actifs, en effet l'EIPA réduit l'efflux de protons d'environ 85 % (Figure 2 de l'article ci-dessus). Par ailleurs, NHE1 semble également participer à la régulation du pH des cellules MDA-MB-435s (Figure 33), ne possédant pas de canaux

sodiques dépendants du voltage fonctionnels (données du laboratoire). Dans ces cellules invasives MDA-MB435s, la régulation du pH fait intervenir en plus des échangeurs sodium-protons, des transporteurs utilisant du bicarbonate, contrairement aux cellules MDA-MB-231 (Figure 33).

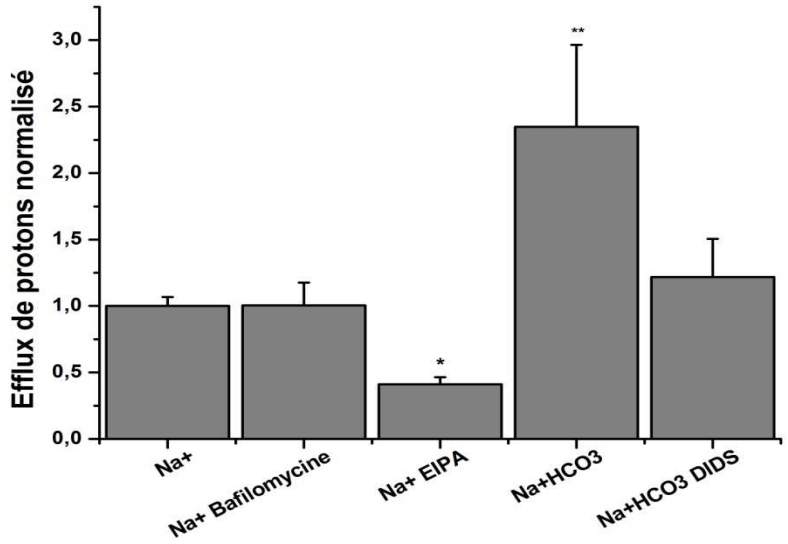


Figure 33 : Régulation du pH des cellules cancéreuses mammaires invasives MDA-MB-435s.
L'efflux de protons est calculé à partir de la vitesse d'alcalinisation induite par l'ajout de sodium dans des cellules acidifiées. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (ajout de NaCl). La bafilomycine (100 nM) n'a pas d'effet sur l'efflux de protons alors que l'EIPA (10 µM) le réduit de 60 %. L'ajout de bicarbonate ainsi que l'utilisation du DIDS pour inhiber les transporteurs de bicarbonates permet de démontrer l'implication de ces transporteurs dans cette lignée. n=3 expériences indépendantes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ par rapport au contrôle Na^+.

Ces trois lignées cellulaires comparées, deux lignées fortement invasives (MDA-MB231 et MDA-MB-435s) et une lignée faiblement invasive (MCF-7) (Freund *et al.*, 2003; Sommers *et al.*, 1994) présentent toutes des échangeurs sodium-proton actifs. Les deux lignées cancéreuses mammaires ne possédant pas de canal $Na_V1.5$ fonctionnel ni d'autres isoformes de Na_V utilisent également NHE1 pour réguler leur pH_i. Cette étude fonctionnelle confirme ce qui avait été suggéré par l'analyse de l'expression en ARNm de NHE1 dans plusieurs lignées épithéliales mammaires (Figure 28) et donc le caractère ubiquitaire de NHE1. NHE1 n'est donc pas spécifique de la lignée MDA-MB-231 et il n'existe pas de relation entre le niveau d'invasivité des cellules et la présence de NHE actifs dans les lignées étudiées ni avec l'expression d'un canal $Na_V1.5$ fonctionnel. Ces études permettent de démontrer le rôle des

échangeurs sodium-proton lors d'une acidification intracellulaire mais ne renseignent pas de l'activité de ces transporteurs dans les cellules lorsque le pH est à l'équilibre. Néanmoins, les mesures de pH intracellulaire à l'équilibre dans les cellules MDA-MB-231, sans acidification préalable, en présence d'un siNHE1 indiquent que le pH intracellulaire pourrait être diminué en présence de ce siRNA (pH_i = 6,98 ± 0,04 pour les siCTL et 6,88 ± 0,03, n=3 *P*=0,07). Ces mesures, effectuées sur une population cellulaire devraient être confirmées sur des cellules isolées. De plus, le pH_i mesuré ici correspond à un pH_i global qui pourrait être différent dans certaines zones cellulaires en fonction de l'expression et de la localisation de NHE1.

Le rôle de NHE1 dans la régulation du pH intracellulaire et par conséquent du pH périmembranaire est conforté par l'observation d'une alcalinisation périmembranaire lorsque l'activité de NHE1 est inhibée par l'EIPA (Figure 34). Les valeurs de pH extracellulaire sont relativement élevées comparées à la description d'un pH extracellulaire généralement acide des cellules cancéreuses. Les mesures de pH périmembranaire effectuées ici correspondent au pH global des cellules, des différences pourraient exister en fonction de différents domaines cellulaires où le pH pourrait être beaucoup plus acide tels que les invadopodes, lieu de dégradation de la matrice extracellulaire. En effet, une étude sur ces même cellules MDA-MB-231 démontre que le pH extracellulaire à proximité des invadopodes se situe autour de 6,36 alors que le pH autour des cellules est plus alcalin autour de 7,43 (Busco *et al.*, 2010). Un gradient de pH extracellulaire est également observé entre le bord avant plus acide et le bord arrière plus alcalin de cellules en migration (Stock *et al.*, 2007; Stuwe *et al.*, 2007). Réciproquement, le pH_i est plus alcalin dans les invadopodes (Magalhaes *et al.*, 2011) ou au niveau du bord avant des cellules en migration (Martin *et al.*, 2011) où est localisé NHE1. De plus, la méthode de calibration utilisée tend à sous-estimer les variations de pH à proximité des cellules. Le pH à proximité de la sonde fluorescente n'est pas identique à celui de la solution de perfusion du fait de la diffusion des protons dans la solution extracellulaire. Il apparaît nécessaire de mesurer le pH intracellulaire et périmembranaire des cellules MDA-MB-231 de manière plus précise par l'utilisation d'un fluorophore sensible au pH couplé à de la microscopie confocale et de l'analyse spectrale. Ces données pourraient permettent l'établissement d'une « carte » du pH des cellules MDA-MB-231 qui associées à différents marqueurs permettraient d'identifier des micro-domaines où le pH extracellulaire pourrait être plus acide.

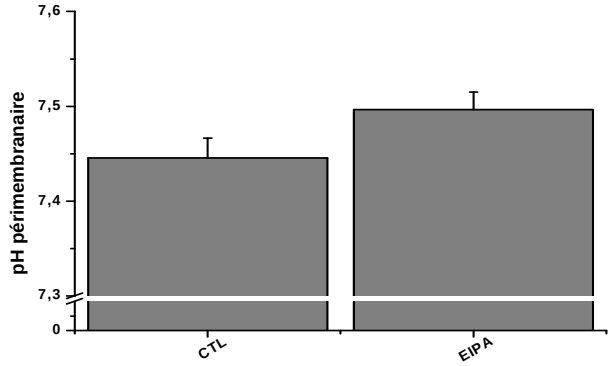


Figure 34 : Régulation du pH périmembranaire des cellules MDA-MB-231 par NHE1.

Le pH périmembranaire est mesuré à l'aide d'une sonde fluorescente sensible au pH et s'intégrant dans le feuillet externe de la membrane plasmique (DHPE). Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24h avec 1 µM d'EIPA. *P* = 0,07 n= 19 cellules pour CTL et 22 pour EIPA.

L'échangeur sodium-proton NHE1 semble donc posséder un rôle important dans la régulation du pH des cellules MDA-MB-231. En revanche l'étude de l'expression des ARNm de transporteurs de bicarbonates suggérait une expression différente de NBCe1 dans les différentes lignées étudiées (Figure 28) or la présence de bicarbonates ou d'un inhibiteur de ces transporteurs ne modifie pas l'efflux de protons induit par l'addition de sodium dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 1 de l'article ci-dessus). Dans ces cellules, ce transporteur ne semble pas être actif du moins pour son rôle dans la régulation du pH et donc pas impliqué dans l'acidification extracellulaire induite par l'activité du canal $Na_V1.5$. Ceci pourra être confirmé par l'utilisation d'un siRNA spécifique de NBCe1. Au contraire, des transporteurs de bicarbonates semblent actifs dans les cellules MDA-MB-435s. L'expression des ARNm de transporteurs de bicarbonates dans cette lignée permettrait d'identifier quel régulateur pourrait être impliqué dans la régulation du pH. Une étude rapporte que les cellules cancéreuses hautement invasives MDA-MB-231 utilisent majoritairement la V-ATPase pour réguler leur pH et que les cellules moins invasives MCF-7 ont une activité de la V-ATPase moins importante et utilisent plutôt les échangeurs sodium-proton et les transporteurs de bicarbonates (Sennoune *et al.*, 2004). Bien que nous n'ayons pas mesuré l'influence d'un inhibiteur de la V-ATPase dans les cellules MCF-7, son utilisation dans les cellules MDA-MB-231 n'a aucun effet sur l'efflux de protons induit par l'ajout de sodium dans des cellules acidifiées. Par ailleurs, l'effet toxique de la bafilomycine observé sur les cellules MDA-MB-231 n'a pas permis son utilisation pour des tests d'invasivité cellulaire. Ces

différences peuvent s'expliquer par des différences de conditions de mesures telles que la mise en suspension des cellules ou par l'ajout de sodium induisant le fonctionnement des échangeurs dépendants du sodium et qui pourrait masquer le fonctionnement d'autres transporteurs tels que la V-ATPase. Il est donc difficile d'exclure une participation de la V-ATPase dans la régulation du pH des cellules MDA-MB-231. Pour cela, il faudrait mesurer l'efflux de protons de cellules sans sodium ni bicarbonates en présence ou non de bafilomcycine. Les mesures de pH intracellulaire ont été effectuées sur des cellules en suspension, des différences pourraient donc être rencontrées lors de ces mêmes mesures sur des cellules adhérentes à l'aide d'un microscope équipé pour des mesures de microspecrofluorimétrie et d'un système de perfusion.

Nous avons montré que l'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ par son inhibiteur pharmacologique (TTX) ou par un siRNA réduit l'efflux de protons des cellules MDA-MB-231 d'environ 30 % (Figure 2 de l'article ci-dessus). NHE1 étant la protéine majoritairement impliquée dans l'efflux de protons des cellules MDA-MB-231, l'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait augmenter celle de NHE1 conduisant à l'acidification périmembranaire précédemment démontrée (Gillet *et al.*, 2009). Les études comparatives de la régulation du pH dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires ont montré que les échangeurs sodium-proton étaient des protéines dont l'activité est ubiquitaire, suggérant que l'effet du fonctionnement du canal $Na_V1.5$ sur la régulation du pH implique la régulation de l'activité d'une protéine ubiquitaire, NHE1 et non l'induction de l'expression de nouvelles protéines. $Na_V1.5$ potentialiserait donc l'activité de NHE1, connu pour être surexprimé dans les cellules cancéreuses.

L'entrée de sodium par le canal $Na_V1.5$ est nécessaire à son effet sur le pH puisque l'inhibition pharmacologique (TTX) ou moléculaire par un siRNA de $Na_V1.5$ a le même effet sur l'activité de NHE1 (Figure 2 de l'article ci-dessus). Un rôle indépendant du transport de sodium par le canal peut donc être exclu à moins que la TTX empêche un changement conformationnel du canal, ce qui ne semble pas être le cas puisqu'elle agit en bouchant le pore. Par ailleurs, la spécificité de cette relation entre NHE1 et $Na_V1.5$ est démontrée par l'effet unique de l'activité de $Na_V1.5$ sur celle de NHE1 et non l'inverse ; l'inhibition de NHE1 ne modifie ni l'expression de $Na_V1.5$, ni le courant sodique ni la fenêtre de voltage pour laquelle le canal est actif (Figure 2 et Figure supplémentaire de l'article ci-dessus). Un effet non spécifique de la TTX est exclu puisque cet inhibiteur pharmacologique n'a pas d'effet sur l'activité de NHE1 des cellules MCF-7 n'exprimant pas de canal $Na_V1.5$

fonctionnel (Figure 2 de l'article ci-dessus). Enfin, il avait été précédemment démontré que l'activité du canal $Na_V1.5$ ne régule ni l'expression ni la sécrétion des cathepsines à cystéine B et S ce qui pourrait suggérer une régulation de leur activité (Gillet *et al*., 2009). Nous avons également vérifié que l'expression de NHE1 ne modifie pas l'expression des cathepsines à cystéine B et S (Figure 35).

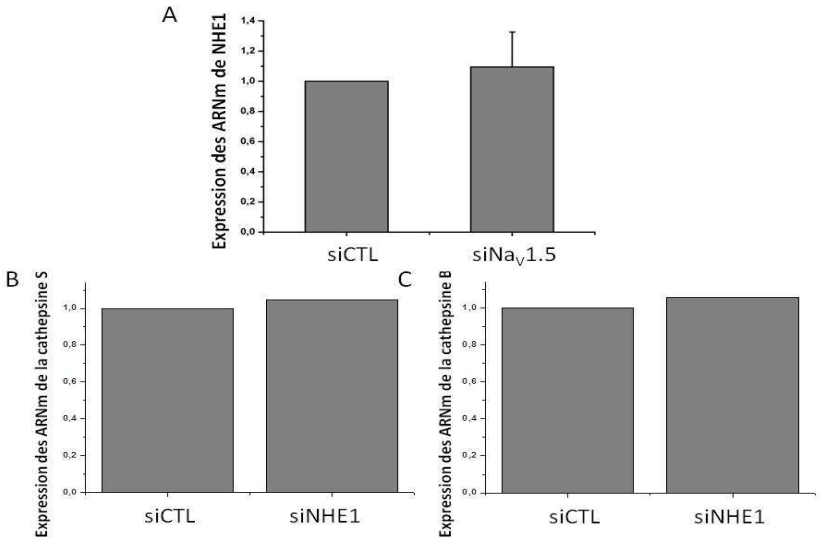


Figure 35 : Effet des siRNA dirigés contre $Na_V1.5$ sur l'expression de NHE1 et contre NHE1 sur l'expression des cathepsines B et S.

A. Effet du si$Na_V1.5$ sur l'expression des ARNm de NHE1 évalué par PCR en temps réel (n=3) *P* = 0,5 B et C. Effet du siNHE1 sur l'expression des cathepsines à cystéines B et S (n=1).

L'activité du canal $Na_V1.5$ ne régule pas la quantité d'ARNm de NHE1 (Figure 35) ni de protéines NHE1 fonctionnelles (Figure 2 de l'article ci-dessus) mais semble uniquement réguler l'activité de NHE1. L'inhibition de NHE1 ou de $Na_V1.5$ par leurs inhibiteurs pharmacologiques ou par des siRNA réduit d'environ 30 % l'invasivité cellulaire. L'inhibition simultanée de ces deux protéines n'a pas d'effet additif (Figure 3 de l'article ci-dessus). Ce mécanisme est spécifique de l'invasivité cellulaire et pas de la migration. En effet, les cellules migrent de la même manière lorsque $Na_V1.5$ est inhibé, de même aucun effet additif sur la migration cellulaire n'est observé lors de l'inhibition simultanée de NHE1 et $Na_V1.5$ (Figure 31). Des résultats similaires aux tests d'invasivité ont été obtenus lors de

mesures de dégradation protéolytique par un substrat de protéases (DQ-Gelatin) : l'inhibition simultanée de NHE1 et de $Na_V1.5$ n'a pas d'effet supplémentaire (Figure 3 de l'article ci-dessus). Ces résultats suggèrent que $Na_V1.5$ et NHE1 participent à une même voie favorisant l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Par un mécanisme encore inconnu $Na_V1.5$ stimule l'activité de NHE1 qui pourrait ainsi induire une acidification périmembranaire et augmenter l'activité des cathepsines favorisant l'invasivité cellulaire.

Cette régulation de NHE1 par l'activité du canal $Na_V1.5$ ne peut pas s'expliquer par un effet du gradient de concentration du sodium puisque l'entrée de sodium par le canal $Na_V1.5$ aurait tendance à diminuer le gradient de sodium et donc à réduire l'activité de NHE1 or l'inverse est observé. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant cette régulation de NHE1 par l'activité du canal $Na_V1.5$. L'activité de $Na_V1.5$ pourrait activer des voies de signalisation ou des interactions dépendantes du sodium qui stimuleraient NHE1. De plus, une proximité (soit directe soit via des protéines d'interactions) entre ces deux protéines pourrait permettre l'établissement d'une signalisation dépendante du sodium localisée et favoriser leur interaction fonctionnelle.

Bien que le rôle du sodium dans la signalisation cellulaire soit souvent attribué à une entrée de calcium par l'échangeur sodium/calcium une voie de signalisation dépendante du sodium a été décrite dans des cellules rénales. Dans ces cellules, l'augmentation de la concentration en sodium intracellulaire augmente l'expression membranaire de la pompe Na^+/K^+ en stimulant la PKA, indépendamment de l'AMPc, (Vinciguerra *et al.*, 2003; Vinciguerra *et al.*, 2005). L'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait, sans modifier la quantité de protéine NHE1 totale, augmenter le recrutement de NHE1 au niveau de la membrane plasmique ou sa réorganisation membranaire dans des zones spécifiques telles que les invadopodes, conduisant à une augmentation de l'activité de NHE1. Afin d'identifier si ce mécanisme existe, des protéines membranaires de cellules traitées ou non par la TTX ou par un siRNA dirigé contre les ARNm de $Na_V1.5$ pourront être comparées aux protéines totales par plusieurs techniques permettant d'isoler les protéines membranaires. Une ultracentrifugation (100 000 x g) permet de séparer les protéines membranaires, retrouvées dans le culot, des protéines cytosoliques. Il est également possible d'isoler les protéines membranaires par un cross-linker couplé à une molécule de biotine et ne traversant pas les membranes cellulaires. Les protéines marquées sont précipitées par des billes couplées à de la streptavidine puis révélées par western blotting. Enfin la microscopie confocale permet de visualiser les protéines exprimées au niveau de la

membrane plasmique ou de zones spécifiques et celles situées dans les compartiments intracellulaires.

Une étude utilisant un siRNA dirigé contre les ARNm de $Na_V1.5$ propose un modèle dans lequel $Na_V1.5$ serait à la base d'un « réseau » de signalisation permettant l'invasivité des cellules de cancer du colon en contrôlant l'expression de gènes notamment liés à la voie de signalisation Wnt, à la migration cellulaire ou encore au contrôle du cycle cellulaire (House *et al*., 2010). Une de ces voies pourrait participer à la régulation de l'activité de NHE1.

Il a été suggéré que l'activité du canal $Na_V1.5$ dans les cellules MDA-MB-231 pouvait stimuler l'activation de la PKA (Chioni *et al*., 2010). De plus, la PKA permet d'inhiber une voie de signalisation impliquant RhoA, P160ROCK et p38 MAPK, cette inactivation de p38 MAPK induisant l'activation de NHE1 (Cardone *et al*., 2005a; Cardone *et al*., 2008) (Figure 36).

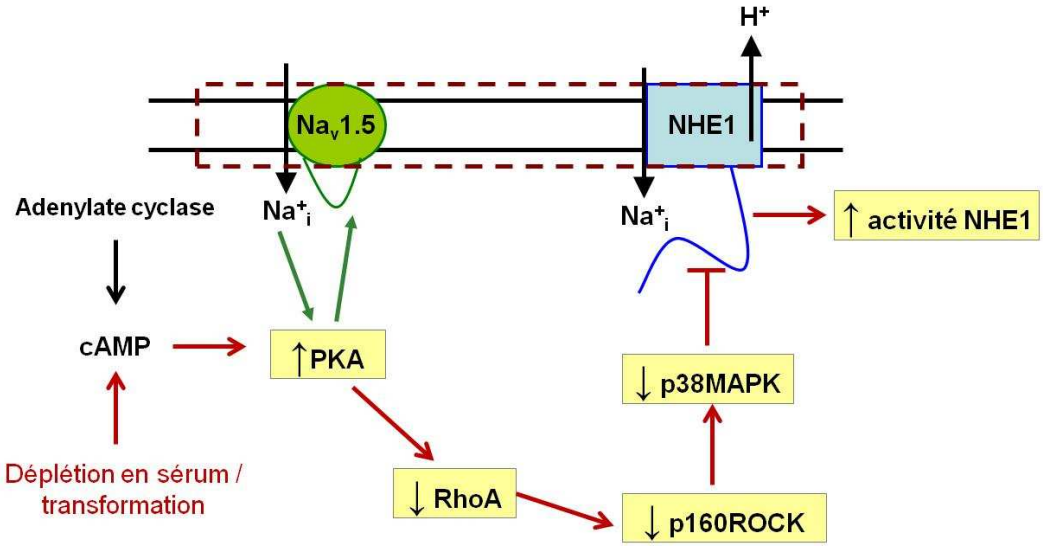


Figure 36 : Schéma hypothétique d'une voie de signalisation impliquant la PKA et p38MAPK

Les flèches vertes indiquent la voie suggérée par Chioni *et al*., 2010, celles en rouge la voie décrite par Cardone *et al*., 2005a et 2008.

Afin d'évaluer le rôle de cette voie de signalisation dans l'activation de NHE1 par l'activité du canal $Na_V1.5$, l'influence de la PKA et de p38 MAPK ont été mesurées sur l'activité de NHE1. Dans ce modèle, l'activation de la PKA devrait induire une augmentation de l'activité de NHE1. Les cellules mises en présence de 30 µM de forskoline pendant 24h, activateur de l'adénylate cyclase induisant une augmentation de la production de l'AMP cyclique (AMPc) et donc l'activation de la PKA, présentent une légère augmentation de l'activité de NHE1 de

16 % (Figure 37). Inversement, l'inhibition de la PKA par le KT5720 (0,5 µM pendant 24h) diminue l'efflux de protons de 13 % (Figure 37). Cette voie de signalisation aurait comme effecteur final la kinase p38 dont l'activation diminue l'activité de NHE1. L'activation de p38 MAPK par l'anisomycine (100 nM pendant 24h) diminue de 43 % l'efflux de protons (Figure 37), suggérant que cette voie de signalisation peut réguler l'activité de NHE1 dans les cellules MDA-MB-231.

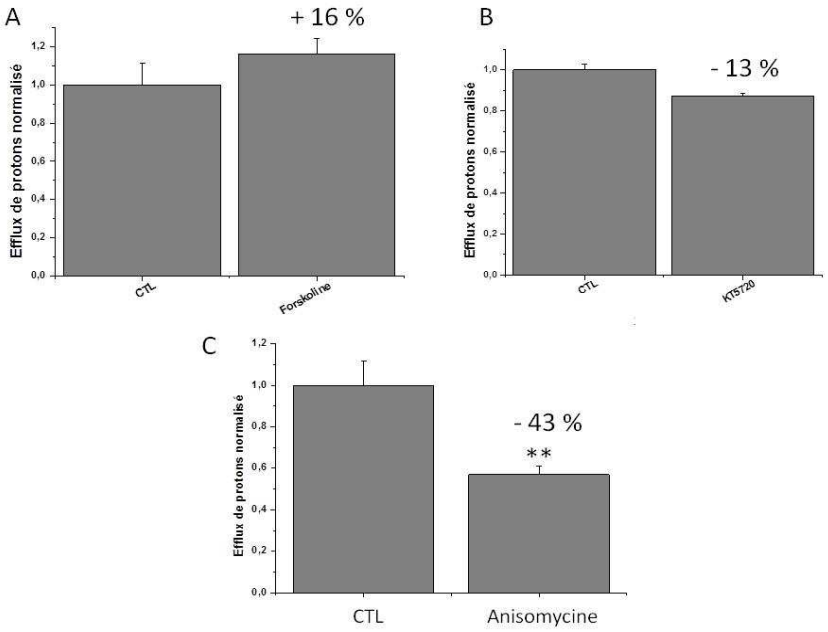


Figure 37 : Régulation de NHE1 par la PKA et p38 MAPK.

A. L'activation de la PKA par un traitement des cellules pendant 24h avec 30 µM de forskoline a tendance à augmenter l'efflux de protons (n=4, *P* = 0,49). B. L'inhibition de la PKA par un traitement des cellules pendant 24h avec 0,5 µM de KT5720, a tendance à diminuer l'efflux de protons (n=2). C. Effet de l'activation de p38 MAPK avec 100 nM d'anisomycine pendant 24h sur l'efflux de protons (n=5, *P* = 0,008). ** *P* < 0,01 par rapport au contrôle.

Afin d'étudier l'implication du canal $Na_V1.5$ sur cette voie de signalisation, la quantité de p38 phosphorylée après 24 h de traitement par 30 µM de TTX a été évaluée par western blotting. Alors que l'anisomycine augmente la phosphorylation de la kinase p38 comme attendu, la TTX n'a aucun effet sur celle-ci en condition basale (Figure 38). Une voie de signalisation impliquant p38 MAPK ne semble donc pas directement impliquée dans la régulation de NHE1 par l'activité du canal $Na_V1.5$. Ces résultats sont à confirmer par une étude cinétique de la phosphorylation de p38MAPK différents temps après traitement des cellules par de la TTX, en normalisant par rapport à la quantité de p38 totale et en étudiant l'effet de la TTX sur l'activation de p38. L'effet de l'entrée de sodium par le canal $Na_V1.5$ sur l'adénylate cyclase

pourra être mesuré grâce à une sonde fluorescente basée sur le principe du FRET et permettant l'évaluation de la quantité d'AMPc (Adams *et al.*, 1991).

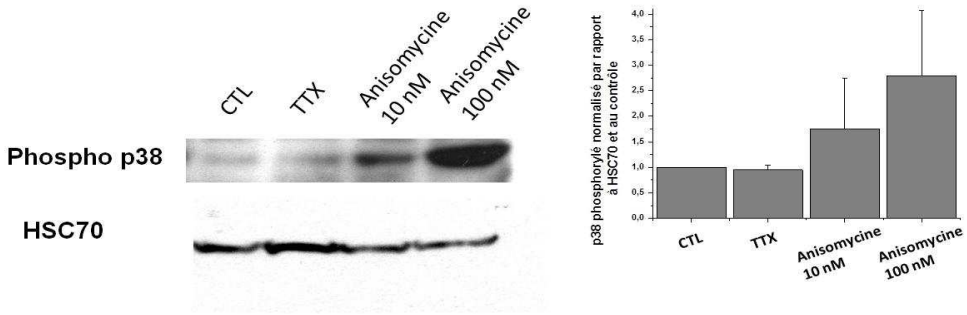


Figure 38 : Effet de la TTX sur la phosphorylation de p38.

Western blot représentatif de l'effet de 30µM de TTX, de 10 et 100 nM d'anisomycine sur la phosphorylation de p38 MAPK. A droite, quantification par densitométrie (n=2).

D'autres voies de signalisation pouvant être communes restent à explorer. Des résultats préliminaires indiquent que l'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait réguler l'activation de ERK 1/2. En effet, l'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ par la TTX induit après 5 minutes une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 (Erk 1 sur Thr202 et/ou Tyr 204 et Erk2 sur Thr 185 et/ou Tyr 187) puis une augmentation de cette phosphorylation pour des temps plus longs et un retour au même niveau de phosphorylation que pour la condition contrôle après 24h de traitement (Figure 39). Il a été démontré une régulation de ERK 1/2 par le canal $Na_V1.5$ dans des cellules endothéliales (Andrikopoulos *et al.*, 2011; Traub *et al.*, 1999). NHE1 peut également être régulé par ERK 1/2 qui active la kinase $p90^{RSK}$ (p90 ribosomal S6 kinase) et phosphoryle NHE1 pour permettre de l'activer en réponse à des facteurs de croissance (Takahashi *et al.*, 1999).

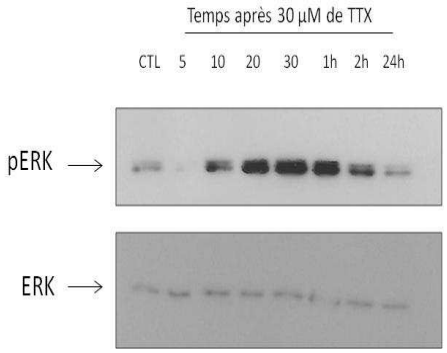


Figure 39 : Activation de la phosphorylation de ERK1/2 par l'inhibition du canal $Na_V1.5$.

Western Blot représentatif de trois expériences indépendantes.

Les cascades de phosphorylation sont complexes et régulées par de multiples voies dont certaines ne sont sûrement pas encore connues. Le rôle de voies de signalisation dans l'invasivité cellulaire due à l'activité du canal $Na_V1.5$ reste à approfondir. Un système de détecteur de sodium intracellulaire pourrait exister pour activer des voies de signalisation conduisant à une augmentation d'activité de NHE1. De plus, cette étude sur de potentielles voies de signalisation, pourra être complétée par l'analyse du rôle de phosphatases qui peuvent être impliquées dans la régulation de la signalisation cellulaire. Les conditions de culture peuvent également modifier les mécanismes cellulaires. Dans le modèle présenté les cellules ne sont pas cultivées dans une atmosphère hypoxique ni dans un milieu pauvre en nutriments ce qui ne représente pas au mieux l'environnement tumoral. Or ces conditions sont connues pour modifier l'expression (Rios *et al.*, 2005) ou l'activité de NHE1 (Reshkin *et al.*, 2000a).

Un rapprochement entre NHE1 et $Na_V1.5$ pourrait permettre au sodium transporté par $Na_V1.5$ de modifier l'activité de NHE1. Ceci est supporté par l'observation de la co-localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ par immunofluorescence et de leur localisation dans les domaines membranaires riches en cavéoline-1 démontrée par fractionnement membranaire. Les radeaux lipidiques sont des zones membranaires enrichies en sphingolipides et en cholestérol, connues pour être des plateformes de signalisation contenant de nombreuses protéines membranaires (Pike, 2003; Simons and Ikonen, 1997). NHE1 est retrouvé dans les domaines membranaires contenant de la cavéoline dans d'autres modèles cellulaires (Bullis *et al.*, 2002; Willoughby *et al.*, 2005). La première étude rapportant la localisation de NHE1 dans ces domaines démontre que la déstabilisation du cytosquelette d'actine n'affecte pas sa localisation dans ces fractions membranaires mais que la déstabilisation des radeaux lipidiques avec un agent qui extrait le cholestérol (méthyl-β-cyclodextrine) augmente l'activité d'efflux de protons de NHE1 (Bullis *et al.*, 2002). Il a été démontré dans un modèle de fibroblastes que la déstabilisation des radeaux lipidiques par ce même agent délocalise NHE1 en dehors des domaines riches en cavéoline-1 et augmente son activité (Tekpli *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans les cellules MDA-MB-231, NHE1 est également retrouvé dans ces micro-domaines membranaires où il participe à l'acidification du microenvironnement pour favoriser l'activité de la cathepsine B et augmenter l'invasivité cellulaire. Dans cette même étude, la stimulation du récepteur CD44 par l'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire induit le recrutement de NHE1 dans les zones membranaires riches en cavéoline-1 ce qui augmente son activité (Bourguignon *et al.*, 2004). Ces résultats contradictoires, ne permettent pas de conclure sur

l'activation de NHE1 dans les radeaux lipidiques ou en dehors. Cette régulation de l'activité de NHE1 dans ces micro-domaines membranaires pourrait dépendre du type cellulaire et de l'environnement protéique et lipidiques retrouvé à proximité de NHE1 dans les radeaux lipidiques. Enfin, les canaux sodiques $Na_V1.5$ sont retrouvés dans des domaines membranaires enrichis en cavéoline des cellules cardiaques. La cavéoline-3 interagit avec le canal $Na_V1.5$ et régule son activité (Yarbrough *et al.*, 2002). Ainsi, des mutations sur le gène codant pour la cavéoline-3 sont associées à des syndromes de QT longs (Vatta *et al.*, 2006) et à la mort subite du nourrisson (Cronk *et al.*, 2007).

Les radeaux lipidiques sont connus pour permettre la compartimentalisation de différents processus cellulaires. Ils permettent le rapprochement de molécules de signalisation cellulaires et sont donc présentés comme des plateformes de signalisation impliquées notamment dans le trafic de vésicules (Helms and Zurzolo, 2004) ou la transduction du signal (Harvey and Calaghan, 2012; Simons and Toomre, 2000). Indépendamment de l'expression de NHE1 ou de $Na_V1.5$, les radeaux lipidiques sont impliqués dans l'agressivité des cellules cancéreuses (Patra and Bettuzzi, 2007). Il a été démontré que ces domaines contiennent des protéases essentielles à la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Dans des cellules cancéreuses de prostate, la cavéoline-1 est co-localisée avec MT1-MMP ce qui participe à l'invasivité de ces cellules (Wang *et al.*, 2009). Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) et la MMP9 sont situés dans les domaines membranaires riches en cavéoline. La déstabilisation de ces domaines membranaires, les délocalise et diminue la migration et l'invasivité cellulaire (Raghu *et al.*, 2010).

Nous avons démontré pour la première fois que dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, $Na_V1.5$ était situé dans des zones membranaires particulières enrichies en cavéoline-1 où il était associé à NHE1. Le rapprochement de ces deux protéines, connues pour interagir avec de nombreux partenaires protéiques, pourrait permettre de favoriser leur interaction fonctionnelle. Ainsi les radeaux lipidiques pourraient être des zones ou le pH extracellulaire serait plus acide pour permettre une dégradation localisée de la matrice extracellulaire. Afin de confirmer cette hypothèse, une meilleure caractérisation des radeaux lipidiques isolés est nécessaire. En effet, le protocole utilisé ne permet pas de distinguer les radeaux lipidiques riches en cavéoline (cavéoles) de ceux ne contenant pas cette protéine ainsi que ceux situés sur la membrane plasmique ou sur les autres membranes intracellulaire. Pour cela, il serait nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs tels que la flotilline et des marqueurs de

membranes intracellulaires ou de procéder à un enrichissement en membranes plasmiques préalablement à ce fractionnement membranaire. Les résultats obtenus avec cette technique de fractionnement sans utilisation de détergent pourront être comparés à une technique de fractionnement membranaire basée sur l'insolubilité des radeaux lipidiques dans des détergents doux. Il est également possible de visualiser les radeaux lipidiques par microscopie à l'aide de la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à un fluorophore qui se fixe sur le ganglioside GM1 (Fra *et al.*, 1994; Harder *et al.*, 1998) situé dans les radeaux lipidiques (Parton, 1994). Cette technique, couplée à une sonde fluorescente sensible au pH permettrait d'étudier l'influence de la localisation de NHE1 dans ces zones sur leur pH extracellulaire. De plus, un substrat fluorescent de dégradation protéolytique permettrait d'étudier la dégradation de la matrice extracellulaire dans ces zones membranaires. Il est également possible de déstabiliser les radeaux lipidiques en déplétant le cholestérol avec un agent de la famille des cyclodextrines ou en inhibant la synthèse de cholestérol par des statines, afin d'étudier le rôle de la localisation de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans ces zones membranaires.

NHE1 et $Na_V1.5$ sont deux protéines membranaires connues pour avoir de nombreux partenaires protéiques, parmi ceux-ci, plusieurs peuvent être communs. NHE1 et $Na_V1.5$ interagissent avec 14-3-3 (Allouis *et al.*, 2006; Lehoux *et al.*, 2001), la calmoduline (Bertrand *et al.*, 1994; Herzog *et al.*, 2003) ou encore des protéines de la famille ERM qui interagissent avec NHE1 (Denker *et al.*, 2000) et avec une autre isoforme de canaux Na_V (Malik-Hall *et al.*, 2003). Une voie de signalisation pourrait exister par l'intermédiaire de ces protéines communes et être favorisée par le rapprochement dans des micro-domaines membranaires.

Le canal sodique dépendant du voltage $Na_V1.5$, exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-231, favorise l'invasivité de ces cellules. Nous avons montré qu'en plus de son rôle dans la prolifération et la migration cellulaire, NHE1 participe à l'invasivité induite par l'activité du canal $Na_V1.5$. En effet, l'activité du canal sodique est capable de stimuler l'activité d'efflux de protons de NHE1 ce qui pourrait permettre d'augmenter l'acidification de l'environnement extracellulaire. Les mécanismes permettant au canal $Na_V1.5$ d'augmenter l'activité de NHE1 restent à élucider afin de mieux comprendre les mécanismes permettant l'invasivité des cellules cancéreuses.

II. Localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les invadopodes

A. Introduction

Les invadopodes sont des protrusions membranaires retrouvées sur les cellules cancéreuses et spécialisées dans l'adhésion et la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces protrusions sont enrichies en F-actine et en protéines associées et sont le site d'une dégradation protéolytique active due à la sécrétion de protéases solubles telles que MMP2, MMP9 ou des cathepsines à cystéine et à l'adressage de protéases membranaires comme MT1-MMP (Linder *et al.*, 2011). De récentes études ont permis de démontrer l'implication des radeaux lipidiques dans la formation et la fonction des invadopodes. Des marqueurs de radeaux lipidiques incluant la cavéoline-1, sont retrouvés dans les invadopodes (Albrechtsen *et al.*, 2011; Caldieri *et al.*, 2009). La déstabilisation des radeaux lipidiques diminue la formation et l'activité de dégradation des invadopodes alors que le cholestérol restore cette fonction (Albrechtsen *et al.*, 2011; Caldieri *et al.*, 2009). Des radeaux lipidiques sont présents dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231 (Yamaguchi *et al.*, 2009) ce qui nous a conduit à rechercher la localisation de $Na_V1.5$ et de NHE1 dans ces structures.

L'objectif de cette étude était d'une part d'étudier la localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les invadopodes des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et d'autre part de mieux définir le lien pouvant exister entre ces deux protéines au sein de ces domaines membranaires. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Reshkin (Université de Bari, Italie) dans laquelle je me suis rendue pendant deux semaines pour apprendre les techniques d'isolement et de visualisation des invadopodes et réaliser l'étude en microscopie confocale. Une partie de cette étude a également été réalisée avec l'équipe du Pr. Counillon (Université de Nice-Sophia Antipolis) où je me suis rendue pour participer à la réalisation des mesures d'activité de NHE1.

B. Résultats préliminaires

Afin de procéder à l'étude de la localisation de différentes protéines dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231 par microscopie de fluorescence, le choix du support de culture est primordial. Les invadopodes, contrairement aux podosomes, sont des structures protrusives nécessitant une matrice extracellulaire pour se former. La forme des cellules MDA-MB-231 et la localisation de plusieurs protéines ont été étudiées par microscopie de fluorescence en présence ou non d'une matrice extracellulaire. Les cellules sont plus allongées lorsqu'elles sont cultivées sur une fine couche de Matrigel™ comparée à une surface de culture en verre sans matrice (Figure 40).

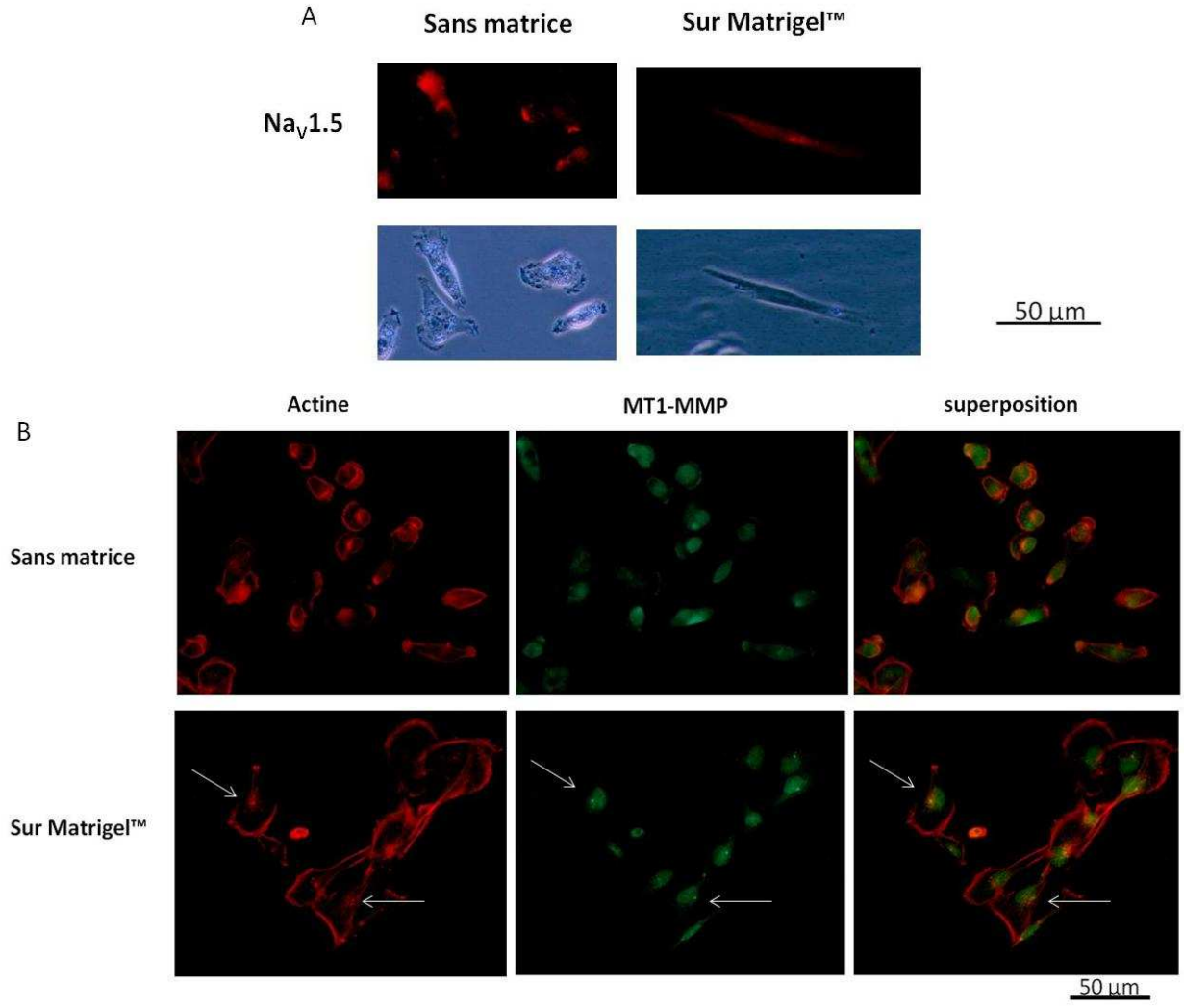


Figure 40 : Comparaison de la forme et de la distribution de $Na_V1.5$, de MT1-MMP et de l'actine en présence ou non d'une matrice extracellulaire.

Le canal $Na_V1.5$ et la protéase MT1-MMP présentent une distribution sensiblement différente. Alors que les cellules cultivées sur un support en verre présentent une répartition de $Na_V1.5$ aux extrémités et uniforme de MT1-MMP, ces deux protéines semblent localisées dans des zones plus précises sur des cellules cultivées sur du Matrigel apparaissant sous forme de points plus concentrés (Figure 40). L'actine F présente également la même répartition. Lorsque les cellules sont cultivées sur du Matrigel™, l'actine F se situe, en plus du pourtour cellulaire, concentrée sous forme de points (Figure 40).

Afin de déterminer si ces zones apparaissant sous forme de points lorsque les cellules sont cultivées sur une couche de Matrigel mimant la matrice extracellulaire correspondent à des invadopodes, leur composition a été étudiée par microscopie de fluorescence. En effet, les invadopodes sont définis comme des zones situées sur la face ventrale des cellules, enrichies en F-actine et présentant une activité de dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. Pour cela, les cellules ont été cultivées sur une matrice de Matrigel, l'actine F ou la cortactine ont été marquées et la dégradation protéolytique détectée par des substrats fluorogéniques de gélatinase (DQ-gelatin™) ou plus spécifiquement de la cathepsine B (MagicRed™). Les zones de dégradation protéolytique se situent dans les zones de condensation de l'actine F (Figure 41). La dégradation de la matrice extracellulaire due à l'activité de la cathepsine B est localisée dans des zones riches en cortactine (Figure 41). De plus, les zones intracellulaires de condensation de l'actine F correspondent à des zones enrichies en cortactine. De même, les substrats utilisés pour les gélatinases et la cathepsines B se superposent. La cathepsine B semble donc jouer un rôle majeur dans l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules MDA-MB-231. L'analyse de ces structures suggère que les zones de dégradation protéolytique sont des structures riches en actine F et en cortactine avec une activité de dégradation de la matrice extracellulaire par la cathepsine B importante (Figure 41).

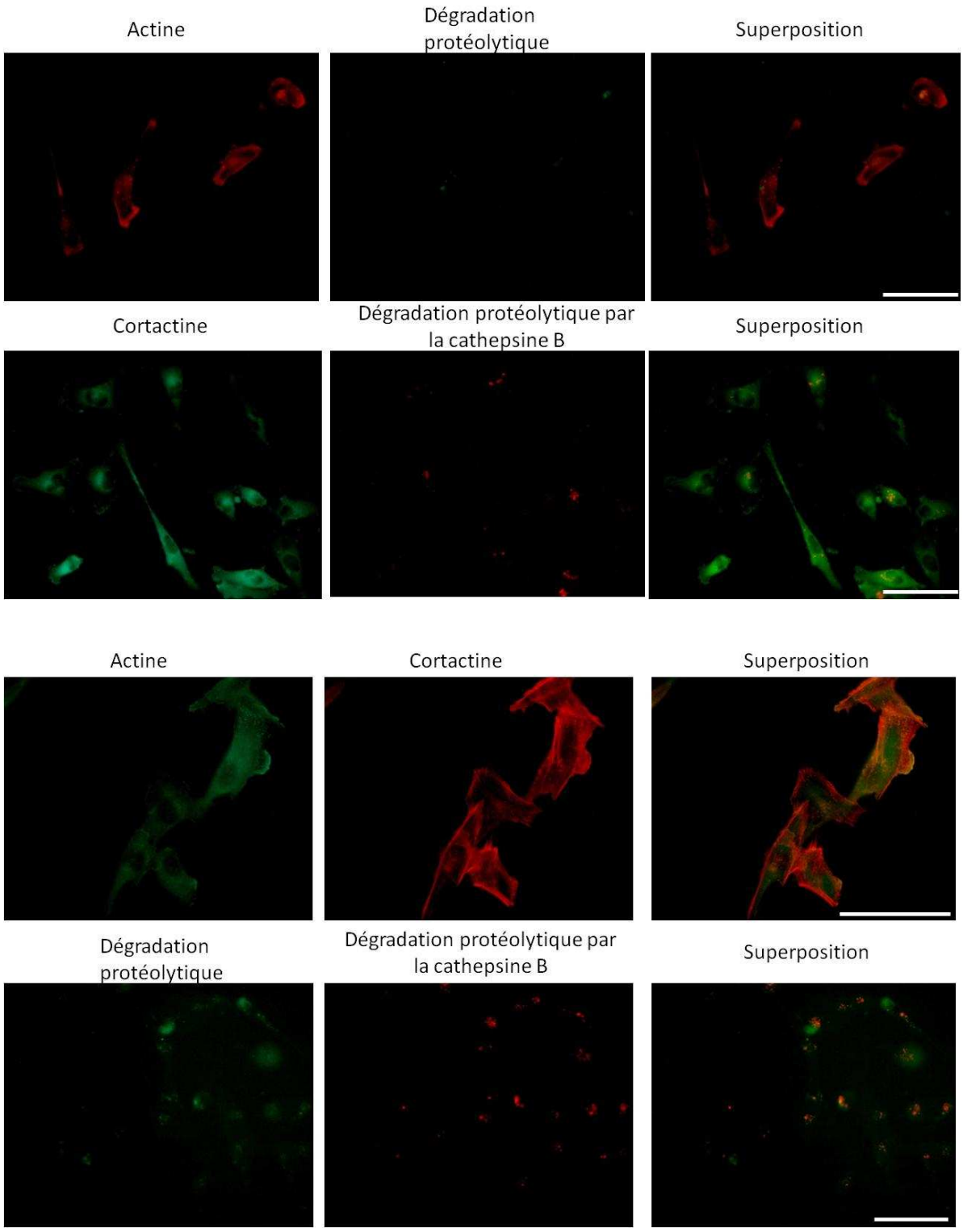


Figure 41 : Caractérisation des invadopodes des cellules MDA-MB-231.

Ces structures sont enrichies en F-actine et cortactine et présentent une activité de dégradation de la matrice extracellulaire par des cathepsines B. L'échelle correspond à 50µm.

Les invadopodes des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 sont bien caractérisés. Plusieurs protéines sont connues pour se situer dans ces zones subcellulaires. Parmi les protéines reconnues pour participer à la fonction protéolytique des invadopodes (Artym *et al*., 2006; Steffen *et al*., 2008), la protéase MT1-MMP se situe également dans les zones de condensation de l'actine de nos cellules (Figure 40). De même, la cavéoline-1 est concentrée au niveau des zones de dégradation de la matrice extracellulaire (Figure 42).

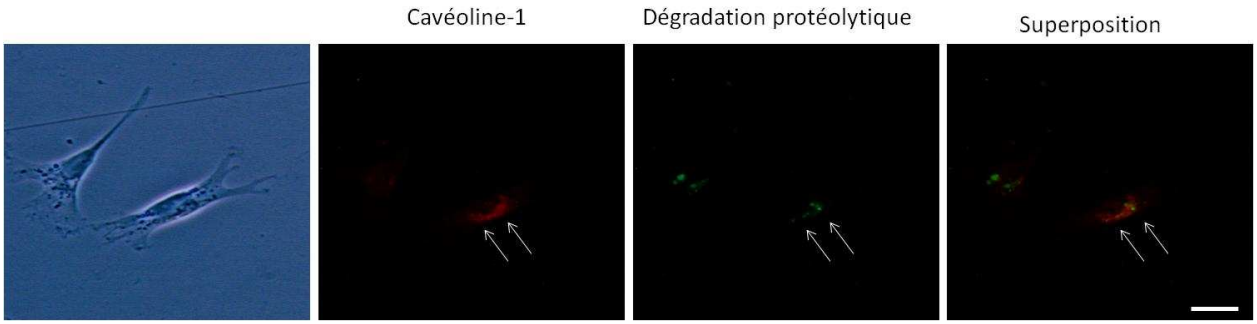


Figure 42 : Localisation de la cavéoline-1 dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231.
L'échelle correspond à 20 µm.

Les structures observées semblent posséder les caractéristiques des invadopodes. Afin de déterminer si NHE1 et $Na_V1.5$ participent à la fonction de dégradation de la matrice par les invadopodes, leur localisation au sein de ces structures a été étudiée également par microscopie de fluorescence. Le canal $Na_V1.5$ présente une distribution subcellulaire surprenante pour une protéine membranaire. Il est localisé au centre des cellules, sous forme de points concentrés. Ces points correspondent à des zones de condensation de l'actine F et également aux sites de dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (Figure 43). Ces observations suggèrent que $Na_V1.5$ pourrait être situé dans les invadopodes. L'échangeur NHE1 possède une répartition plus uniforme, mais il est également présent en quantité importante dans les zones de forte concentration d'actine F (Figure 43).

Ces analyses par microscopie de fluorescence ont permis de documenter la localisation subcellulaire de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les cellules MDA-MB-231. En revanche, cette technique d'imagerie par épifluorescence ne permet pas de déterminer si ces structures sont bien situées sur la face ventrale des cellules en contact avec le Matrigel. Pour cela, des analyses par microscopie confocale et SIM (Structured Illumination Microscopy) ont été réalisées et présentées dans l'article suivant.

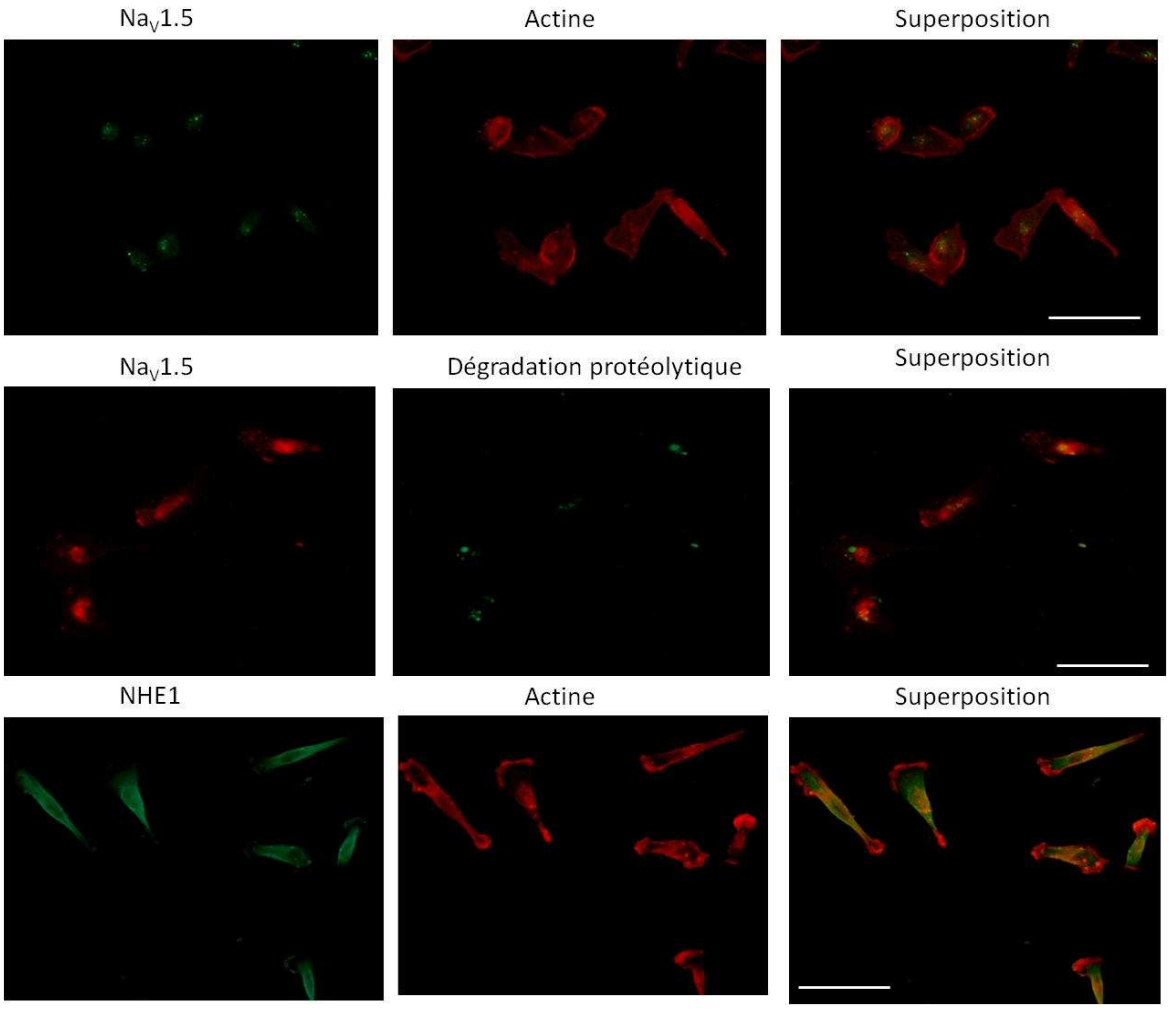


Figure 43 : Localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans des zones riches en actine et dégradation la matrice extracellulaire.

L'échelle correspond à 50 µm.

C. Article 2 : Allosteric modulation of NHE-1 by $Na_V1.5$ sodium channels in caveolin-1 rich breast cancer cell invadopodia

L'étude de la localisation de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans les invadopodes des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ainsi que leur interaction fonctionnelle a conduit à l'article ci-dessous (en préparation).

Allosteric modulation of NHE-1 by $Na_V1.5$ sodium channels in caveolin-1 rich breast cancer cell invadopodia.

BRISSON L., POET M., ANTELMI E., COUNILLON L., RESHKIN S.J., GORÉ J. & ROGER S.

Title page

ALLOSTERIC MODULATION OF NHE-1 BY $Na_V1.5$ SODIUM CHANNELS IN CAVEOLIN-1-RICH BREAST CANCER CELL INVADOPODIA

Lucie BRISSON[1], Mallorie POET[2], Ester ANTELMI[3], Laurent COUNILLON[2], Stephan J RESHKIN[3], Jacques GORE[1] & Sébastien ROGER[1#]

[1] Inserm U1069, Nutrition, Croissance et Cancer ; Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, FRANCE

[2] CNRS UMR 6097; Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté des Sciences Parc Valrose - 06108 Nice, FRANCE

[3] Department of Biosciences, Biotechnology and Pharmacological Sciences, University of Bari, Via Amendola 165A, I-70126 Bari, ITALY

Correspondence should be addressed to:

Dr. Sébastien Roger,

Inserm U1069, 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

Running title: $Na_V1.5$ promotes NHE1 activity in invadopodia

Summary

The proteolysis of the extracellular matrix by cancer cells represents an essential step in metastatic progression. $Na_V1.5$ voltage-gated sodium channels are overexpressed in breast tumours and associated with metastatic occurrence. $Na_V1.5$ activity enhances breast cancer cell invasiveness through a Na^+/H^+ exchanger type 1 (NHE-1)-dependent perimembrane acidification and subsequent degradation of the extracellular matrix. In this study, we characterised MDA-MB-231 breast cancer cell invadopodia using both conventional confocal and high-resolution structured illumination microscopy and showed that NHE-1 and $Na_V1.5$ were co-localised in tubular-shaped invaginations containing caveolin-1 associated with matrix remodelling. We showed that NHE-1 co-immunoprecipited with $Na_V1.5$ and caveolin-1 from cancer cells, consistent with a close association between these three proteins. The expression of $Na_V1.5$ channels in cancer cells is responsible for the allosteric modulation of NHE-1 exchangers, increasing their activity at neutral intracellular pH. Finally, the inhibition of $Na_V1.5$ induced changes in cancer cell morphology and reduction in cortactin phosphorylation and in invadopodial proteolytic activity. Taken together, our study suggests that $Na_V1.5$ and NHE-1 are functionally coupled in caveolin-1 containing domains of invadopodia and that $Na_V1.5$ could induce conformational changes in NHE-1 to promote its H^+-efflux activity and enhance cancer cell invasiveness.

Key words: voltage-gated sodium channels, Na^+/H^+ 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 following the appearance of metastases (Parkin *et al*., 2005). At the cellular level, a determinant step in the development of metastases depends on the acquisition by cancer cells of an invasive potential, mainly relying on the capacity to degrade and migrate through the extracellular matrix (ECM). This is performed by invadopodia which are actin-rich organelles protrusive into the ECM and responsible for its proteolysis through the recruitment of membrane-associated and the release of soluble proteases (Linder et al., 2011). The invadopodial activity seems to be highly dependent on the acidification of the extracellular compartment (Brisson et al., 2012) and Na^+/H^+ exchangers type 1 (NHE-1) were recently shown to be determinant in protons efflux and ECM proteolysis at the peri-invadopodial space (Busco et al., 2010; Magalhaes et al., 2011).

We and others have shown that voltage-gated sodium channels (Na_V) are abnormally overexpressed in cancer cells from different epithelial origins (breast, lung, prostate, colon, cervix) and in melanoma, and proposed that their function could be associated with cancer progression (Allen et al., 1997; Diaz et al., 2007; Diss et al., 1998; Hernandez-Plata et al., 2012; House et al., 2010; Laniado et al., 1997; Roger et al., 2006; Roger et al., 2007; Yildirim et al., 2012). Especially, the $Na_V1.5$ isoform is overexpressed in breast cancer tissues and functional in highly invasive breast cancer cells (Fraser et al., 2005; Gillet et al., 2009; Roger et al., 2003). Moreover, the expression of $Na_V1.5$ channels seems to be associated with metastases development (Fraser et al., 2005; Yang et al., 2012). In highly aggressive human MDA-MB-231 breast cancer cells, the activity of $Na_V1.5$ enhances ECM degradation by increasing the activity of acidic cysteine cathepsins (Gillet et al., 2009). This effect is mediated through an acidification of the pericellular microenvironment, due to the enhancement of the activity of the NHE-1 exchanger through an unknown mechanism (Brisson et al., 2011).

In this study, using biochemical and microscopic techniques (SIM and confocal imaging), we demonstrate that NHE-1, $Na_V1.5$ and caveolin-1 are intimately associated and are co-localised in focal ECM degradation sites corresponding to caveolin-1-containing invadopodia. We found that $Na_V1.5$ activity controls cancer cells morphology, is responsible for the allosteric modulation of NHE-1 and enhances the invadopodial activity.

Results and Discussion

In recent studies, we have shown that the expression and functioning of $Na_V1.5$ channels in highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cells enhance the ECM proteolysis and cell invasiveness by promoting the NHE-1-dependent perimembrane acidification and subsequent cysteine cathepsins activation (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009). Invadopodia and podosomes have been described as key structures involved in matrix remodelling by cancer and non-cancer cells, respectively (Linder, 2007). Therefore, we first analysed the ECM digestive activity from MDA-MB-231 cancer cells grown on a planar matrix of Matrigel™ containing DQ-Gelatin as a fluorogenic substrate for proteases. Multiple subcellular focalized areas of degradation, which could correspond to invadopodial structures, were observed and co-localised with F-actin condensations (Figure 1A). These areas were then analysed by using the high resolution Structured Illumination Microscopy (SIM) imaging (Figure 1B) demonstrating high spots of matrix degradation, surrounded by F-actin rings forming structures of approximately 2 µm diameter in axial (XY) sections (Fig. 1Bb). These structures profoundly penetrated the extracellular matrix (> 5 µm depth) with a cylinder-like F-actin shape, which can be seen on sagittal (XZ) and coronal (YZ) projections (Fig. 1Ba). These structures were identified as penetrating the ECM, below the cell body (Fig. 1Bc). Caveolin-1-containing lipid rafts, also known as caveolae, have emerged as dynamic platforms at the plasma membrane allowing protein clustering and associated with the formation of functional complexes in several biological processes (Harvey and Calaghan, 2012). Recently, several studies have reported the importance of caveolae in the membrane composition and functioning of invadopodia (Caldieri et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009). They were proposed to be critical for the recruitment of components required for the focal degradation of the ECM at the invadopodium (Caldieri and Buccione, 2010; Caldieri et al., 2012; Yamaguchi and Oikawa, 2010). Therefore, we also tested the presence of caveolin-1 at focal points of ECM degradation and found that caveolin-1 was expressed in dots all over the cancer cell but was particularly concentrated around areas of matrix proteolysis (Figure 1C). In a previous study, we proposed that $Na_V1.5$ channels, which enhance cancer cells invasiveness, may functionally interact with NHE-1 in caveolae (Brisson et al., 2011). By using the SIM technology, we found that $Na_V1.5$ and NHE-1 were strongly co-localised in restrictive domains that are protrusive into the extracellular matrix (Figure 2A). However, because the SIM apparatus is only equipped with two lasers, we were unable to address the co-localisation

of $Na_V1.5$/NHE-1 with ECM degradation spots in invadopodia. Therefore, we resorted to the use of two complementary approaches. The first approach was based on the enrichment of invadopodial fractions from MDA-MB-231 grown on a thick matrix of gelatin and the identification of proteins of interest by western blotting, as previously described (Busco et al., 2010). As can be seen in Figure 2B, invadopodial fractions, characterised by the enrichment of cortactin, Focal Adhesion Kinase (FAK) and MT1-MMP (Linder et al., 2011), were containing NHE-1 as previously reported (Busco et al., 2010), but also caveolin-1, $Na_V1.5$, as well as pro- and active-forms of cathepsin B which was demonstrated to be the key protease in the $Na_V1.5$-dependent ECM invasion (Gillet et al., 2009). We also used confocal imaging for studying invadopodia from cells seeded on a layer of Matrigel™ containing BSA-BODIPY-FL. This confirmed the presence of multiple focal areas of matrix proteolysis below the cancer cell body which strongly co-localised with NHE-1 and $Na_V1.5$ (Figure 2C). Taken together these results demonstrate for the first time that $Na_V1.5$ channels are located in invadopodia which are organelles specialized in cancer cell invasiveness. They are found in close proximity with NHE-1 and caveolin-1, both crucial for invadopodial formation and function (Magalhaes et al., 2011; Yamaguchi et al., 2009).

The molecular mechanisms underlying $Na_V1.5$-dependent modulation of NHE-1 are not known. The activity of $Na_V1.5$ channels would normally tend to reduce the electrochemical gradient of Na+ and should counteract NHE-1 activity. However, using fluorescent probes for assessing intracellular pH regulation, we found that $Na_V1.5$ channels are promoting NHE-1-dependent H^+-efflux, leading to the increase of extracellular cathepsins activity and matrix proteolysis (Brisson et al., 2011). We hypothesized that the regulation of NHE-1 activity by $Na_V1.5$ functioning could be due to direct or indirect protein-protein interactions. To further explore this hypothesis, NHE-1 was immunoprecipitated from total MDA-MB-231 cell lysates and both $Na_V1.5$ and caveolin-1 were co-immunoprecipited but not cortactin (Figure 3A). This is consistent with an intimate association between these three membrane proteins. By contrast, $Na_V1.5$ and caveolin-1 were not immunodetected in immunoprecipitates using a mouse IgG as a control antibody. NHE-1 is known to be ubiquitously expressed at the plasma membrane of all mammalian cells and to be crucial in protecting cells from intracellular acidification. NHE-1 has a very low activity at physiological intracellular pH (pHi) and activates rapidly, following a dimeric Monod-Wyman-Changeux cooperative mechanism, when cytoplasm becomes acidic (Lacroix et al., 2004). NHE-1 sensitivity to cytoplasmic protons is known to depend on membrane tension, composition and lipid asymmetry (Pang et

al., 2012; Tekpli et al., 2008), and can be increased by stimulation with hormones and mitogens (Paris and Pouyssegur, 1984). We decided to investigate whether $Na_V1.5$ function could modify the allosteric modulation of NHE-1 activity in breast cancer cells. As can be seen in Figure 3B, cells in which $Na_V1.5$ expression has been inhibited with shRNA have a reduced NHE-1 mediated Li+ uptake for a same pH than control cells expressing $Na_V1.5$. This indicated that $Na_V1.5$ function could allosterically modulate NHE-1 to increase its activity in neutral ranges of pHi.

Knowing the importance of NHE-1 in invadopodial maturation and protease activation (Brisson et al., 2012), we wanted to assess the resulting effect of blocking $Na_V1.5$ channels on the invadopodial activity. This was measured in MDA-MB-231 cells grown in the same conditions as in Figure 1. The number of pixels corresponding to F-actin condensation areas merged to focal spots of DQ-gelatin proteolysis were quantified per cell (Fig. 4A), in three treatment conditions: with 30 µM tetrodotoxin (TTX), 10 µM EIPA or vehicle (control) in order to assess the invadopodial activity. Blocking >90% of sodium currents with TTX and NHE-1 with EIPA resulted in an inhibition of ~40% and of ~60% of the invadopodial activity, respectively (Fig. 4B). MDA-MB-231 breast cancer cells displayed a fibroblast-like shape when grown on a planar layer of Matrigel™, exhibiting a rich F-actin labelling in the barbed-end of the lamellipodial leading edge, as well as at the cell rear end. This particular shape, characteristic of highly invasive cells, was lost when cells were treated with the specific Na_V-channel blocker tetrodotoxin (TTX). In this case the F-actin-cytoskeleton was completely modified and showed a more uniform submembrane localization (Fig. 4C) and was associated with an increase of the circularity index of cancer cells (Fig. 4D). Phosphorylation of cortactin is known to promote the recruitment of NHE1 to invadopodial precursors which induced invadopodia maturation (Magalhaes et al., 2011). Treating cells with 30 µM TTX induced a decrease in Y421 cortactin phosphorylation as soon as 5-10 minutes and which is maintained after 24h in presence of TTX (Figure 4E) suggesting an involvement of $Na_V1.5$ activity in invadopodia formation.

Indeed, $Na_V1.5$ modulates NHE-1 functioning as well as cancer cell morphology, thus resulting in the enhancement of the invadopodial activity and breast cancer cells invasiveness.

Voltage-gated sodium channels (Na_V) have long been considered as being characteristic of excitable cells, such as muscle and neuronal cells, as their activation leads to a sodium influx and to the membrane depolarisation that initiates action potentials (Catterall, 2012). However, different Na_V isoforms have been shown to be overexpressed in cancer cells originating from diverse non-excitable epithelial tissues, and each time this has been investigated, their function was demonstrated to enhance cancer cell invasiveness (Hernandez-Plata et al., 2012; House et al., 2010; Laniado et al., 1997; Roger et al., 2003; Roger et al., 2007). Particularly, in highly invasive breast cancer cells and in high grade breast cancer biopsies, the overexpression of the $Na_V1.5$ isoform has been associated with ECM remodelling and increased probability of developing metastases (Fraser et al., 2005; Gillet et al., 2009; Yang et al., 2012). Therefore, these channels have been proposed to constitute therapeutic targets in the treatment of metastatic breast cancers (Yang et al., 2012). From a mechanistic point of view, it is difficult to understand how such high-voltage activation and fast inactivating channels could exercise their pro-invasive activity. To the best of our knowledge they have not been associated with the triggering of action potentials in cancer cells, and we have proposed that they could be active through a persistent current (in a window of voltage between -60 and -20 mV) at the membrane potential. We have previously demonstrated that $Na_V1.5$ channels promote ECM proteolysis through NHE-1-dependent acidic activation of extracellular cathepsins B and S (Brisson et al., 2011; Gillet et al., 2009). NHE-1 is already known to have a predominant role in extracellular acidification and in the invasiveness of cancer cells (Bourguignon et al., 2004; Busco et al., 2010; Cardone et al., 2005b; Stock and Schwab, 2009) and every signalling pathway increasing its activity could promote cancer progression to an aggressive phenotype. At present, the nature of interaction between $Na_V1.5$ and NHE-1 remained elusive. In this study, we showed for the first time that $Na_V1.5$ channels expressed in breast cancer cells are intimately associated with NHE-1 and that their function allosterically increases NHE-1 activity in near neutral pHi ranges. We propose these interactions to occur in caveolin-1-containing lipid rafts in the invadopodial compartment and to be responsible for an increased ECM degradative activity. The use of the high-resolution structured illumination microscopy, allowed us to describe a particular structure for invadopodia indicating a narrow tubular invagination of F-actin and caveolin-1 into the ECM at the centre of which is recorded the higher degradative activity. This led us to suggest a new hypothesis for the invadopodium structure, presenting a tubular shape in which the ECM degradative activity could be performed both inside and outside. Such a structure would allow a tight control of pH and protease activity inside the invadopodium. Another explanation

could be the endocytosis of degradation products by the invadopodium. This will have to be further studied but could alter the initial model of invadopodial structure. This structure could partially correlate with the protrusive structure of podosomes, observed from dendritic cells using the same technology (Gawden-Bone et al., 2010).

Caveolae are liquid-ordered domains enriched in cholesterol and sphingolipids and assembling membrane proteins into signalling complexes (Harvey and Calaghan, 2012). Cardiac $Na_V1.5$ channels are known to be localised in caveolin-3-containing lipid rafts in ventricular myocytes (Yarbrough et al., 2002) and mutations of caveolin-3 in long QT syndromes have been demonstrated to interfere with $Na_V1.5$ functioning (Vatta et al., 2006). Caveolae have been described as being required for both invadopodia formation and ECM degradative activity (Caldieri et al., 2009; Caldieri et al., 2012; Yamaguchi et al., 2009). Indeed, caveolae could work as a signalling platform in invadopodia for Na_V/NHE-1-dependent cancer cell invasiveness. Because of their invaginated structure, caveolae also provide a restrictive diffusion space for ionic fluxes that could be responsible for local changes in membrane potential and signalling cascades. In this study, we also found that Na_V function regulated the F-actin cytoskeleton of cancer cells and stimulated the acquisition of an aggressive phenotype. This could be in line with the fact that membrane depolarisation has been shown to regulate the actin polymerisation-depolymerisation ratio and, thus, the submembranous F-actin network (Callies et al., 2011). This could also be mediated through NHE-1 regulation which is known to regulate cytoskeleton dynamics by its ability to bind actin-binding proteins of the ERM (ezrin, radixin and moesin) family (Baumgartner et al., 2004; Cardone et al., 2005b). Furthermore Na_V activity could increase cortactin phosphorylation to stimulate NHE-1 and invadopodia maturation.

Very interestingly, functional Na_V channels have also been identified in other non-excitable invasive cells such as T-lymphocytes (Fraser et al., 2004), macrophages (Carrithers et al., 2007) and microglial cells (Black and Waxman, 2012). Blockade of these channels was shown to reduce cell invasiveness. This effect was proposed, at least in macrophages, to depend on the regulation of podosome formation (Carrithers et al., 2009). In conclusion, we have shown that $Na_V1.5$ channels promote the ECM degradation by promoting the activity of NHE-1 in invadopodia of breast cancer cells. The participation of Na_V channels into the constitution and activity of ECM degrading compartments could be a general feature shared by every invasive cancer and non-cancer cells.

Materials and Methods

Inhibitors and chemicals **-** Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Latoxan (France) and was prepared in water supplied with 1/1000 acetic acid. Fluorescent probes were purchased from Invitrogen (France). 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA), and other drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France). Rabbit anti-P-Cortactin (Y421) antibody was from Chemicon (France).

Cell culture **-** MDA-MB-231 human breast cancer cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% FCS, and grown at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Sh$Na_V1.5$ cells were obtained using stable lentiviral transduction. $Na_V1.5$ extinction was checked with qPCR and invasion assays compared to control shRNA (shRD).

Cellular electrophysiology **-** Patch pipettes were pulled from borosilicate glass to a resistance of 4-6 MΩ. Currents were recorded, in whole-cell configuration, under voltage-clamp mode at room temperature (RT) using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument, USA). Sodium currents were recorded from a holding potential of -100 mV to a depolarizing step to -5 mV as already described (Gillet et al., 2009). External solution (in mM): NaCl 140, KCl 4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, D-Glucose 11.1, HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH (1M). Intrapipette solution (in mM) : K-Glutamate 125, KCl 20, $CaCl_2$ 0.37, $MgCl_2$ 1, Mg-ATP 1, EGTA 1, HEPES 10, adjusted to pH 7.2.

Measurement of initial rates of NHE-1 – MDA-MB-231 cells seeded on 24-well plates were acidified in Li^+- and Na^+-free solutions containing 2.5 µM nigericin, 140 mM KCl and calibrated in a range of various pHs varying from 5.2 to 7, as previously described (Lacroix et al., 2004; Milosavljevic et al., 2010). Measurements were performed by 3-minutes incubation in the uptake medium at RT supplemented with 1 mM LiCl, followed by four rapid rinses in ice-cold PBS. Cells were solubilised in 1 N nitric acid, and Li^+ was measured using atomic absorption spectrometry (Zeeman furnace system, Solar 969, Thermo Optek). NHE-1 initial rates were calculated as the cariporide (10 µM)-sensitive Li^+ accumulation per well divided by protein quantities.

Invadopodial fractionation – Breast cancer cells invadopodia, embed into a thick layer of gelatin, were isolated and purified from cytosolic and membrane fractions as previously described (Busco *et al.*, 2010). Briefly, MDA-MB-231 cells were seeded on a thick layer of

gelatin (final concentration of 20 mg/mL in PBS) cross-linked with 0.5% glutaradehyde on ice and fractions were isolated after a hypotonic shock with a swelling buffer (0.2 x PBS supplied with protease inhibitor cocktail, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$ and 1 mM sodium orthovanadate) and cell bodies scraping. Cytosolic fraction was isolated from membranes using centrifugation at 100,000g for 1h10. The gelatin layer containing entrapped invadopodia was collected in 500 µL lysis buffer per dish (5 mM HEPES, 0.5 mM EDTA pH7.2 supplied with 100 µL/mL protease inhibitor cocktail, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM DTT and 0.1% Nonidet P-40), and invadopodial proteins were extracted after 2h30 rotation at 4°C in an orbiting wheel. Fraction containing invadopodia was isolated from gelatin with centrifugation at 17,000 g at 4°C for 30 minutes. Protein samples were separated according to standard SDS-PAGE protocols (Laemmli, 1970) using an equal protein amount, then transferred onto a PVDF membrane (Millipore, USA). Primary antibodies used were: mouse anti-NHE-1 (1/1,500, Chemicon), mouse anti-HSC70 (1/30,000, Santa-Cruz Biotechnology), rabbit anti-caveolin-1 (1/1,000, Cell Signaling), rabbit anti-β-adaptin (1/2,500, BD Biosciences), rabbit anti-human $Na_V1.5$ (1/1000, Sigma), rabbit anti-Focal Adhesion Kinase (FAK, 1/1,000 Santa-Cruz Biotechnology), rabbit anti-human Cathepsin B (1/1,000, Fitzgerald), mouse anti-cortactin (1/1000, Millipore) and rabbit anti-MT1-MMP (1/1000, Millipore). Secondary HRP-conjugated antibodies were: goat anti-mouse (1/3,000), goat anti-rabbit (1/3,000), rabbit anti-β-actin-HRP (1/1,000). Detection was done using the electrochemiluminescence (ECL) kit and Kodak Bio-Max MS films.

***Co-immunoprecipitation assays*-** Cells were washed with PBS and lysed in presence of a lysis buffer (50 mM Tris, pH7, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 1 mM EDTA), containing 1% Triton-X-100 and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, France). Co-immunoprecipitations (co-IP) experiments were performed using Bio-Adembeads PAG magnetic beads (Ademtech, France). Cell lysates (500 µg in 500 µL) were pre-cleared with 20 µL of magnetic beads for 1h. Cell lysates were incubated with 1 µg of antibodies: mouse monoclonal anti-NHE-1, or mouse immunoglobulin G (mIgG) as a negative control overnight at 4°C. Samples were incubated with 20 µL of magnetic beads for 150 min at RT. After incubation, magnetic beads were isolated thanks to a magnetic strand and were washed 5 times with lysis buffer. Pellets were resuspended in 20 µL of 5 x denaturant (SDS) and reducing (β-mercaptoethanol) buffer and boiled for 5 min. 10 µL of samples were loaded in 6 and 10% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Western blotting was performed according to standard protocols.

Fluorescence imaging – MDA-MB-231 cells were cultured on a layer of Matrigel™ for 24h in presence of TTX 30 µM, EIPA 1 µM or vehicle (control condition). Cells were washed in PBS at RT, fixed with 3.7% ice-cold paraformaldehyde/PBS, and washed in ice-cold PBS containing 100 mM glycine. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and saturated with 0.1% gelatin in PBS for confocal imaging, or with a solution containing 50 mM NH_4Cl, 1% BSA, 0.02% saponin and saturated in 3% BSA and 3% NGS for epifluorescence and SIM imaging. Coverslips were incubated 1h to overnight at 4°C with primary antibodies then washed with PBS and incubated at RT for 1h with secondary fluorescent-conjugate antibodies. Coverslips were then washed with PBS and then mounted with ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen). F-actin was stained with phalloidin-Alexa594 (1/200, Invitrogen). Primary antibodies used were polyclonal anti-human $Na_V1.5$ (1/200, Sigma), monoclonal anti-NHE-1 (1/250, Abcam 4E9, or 1/100 Santa-Cruz 4E9), monoclonal anti-caveolin 1 (1/200). Secondary fluorescent-conjugate antibodies used were anti-rabbit TexasRed (1/800), anti-rabbit AlexaFluor350 (1/10,000), anti-goat DyLight488 (1/2,000) and , anti-mouse AlexaFluor568 (1/10,000) .

Epifluorescence imaging - Gelatinolytic activity was assessed by culturing cells for 24h on a planar Matrigel™ matrix containing 25 µg/mL of DQ-Gelatin™. Epifluorescence microscopy was performed with a Nikon TI-S (France) and analysed using the NIS-BR software (Nikon, France). Fluorescence analysis was performed by using the ImageJ© software 1.38I (http://rsbweb.nih.gov/ij). A circularity index was calculated as being $\mathbf{4\pi \times [Area]/[Perimeter]^2}$. As the value approaches 0, it indicates an increasingly elongated shape, and inversely a value of 1.0 indicates a perfect circle.

Structured Illumination Microscopy (SIM) imaging – SIM Experiments were performed at the Nikon Imaging Center at the Institut Curie-CNRS (Paris) and allowed the production of higher resolution images than conventional optical microscopes by analyzing the moiré pattern produced when illuminating the specimen with a high-frequency patterned illumination. Nikon's Structured Illumination Microscopy (N-SIM) technology is using a Nikon Eclipse Ti Inverted Microscope equipped with a MCL Piezo stage, two lasers (a 488 nm,100 mW and a 561 nm 100mW), a 100x CFI Plan Apo TIRF (N.A. 1.49) oil immersion objective, and a EM-CCD Camera iXon DU897 (Andor). Samples and cells were prepared as indicated for epifluorescence imaging experiments.

Confocal imaging - Cells were seeded on a layer of Matrigel™ (4 mg/mL) containing a substrate for digestion localisation (BSA-BODIPY-FL, 30 µg/mL). Cells were observed at 600X magnification in oil immersion 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. For each cell, scanning was conducted with 26 optical series from the top to the bottom of the cell with a step size of 0.25 µm. For every image a Z-stack was acquired using the Metamorph software (Universal Imaging Corp, USA) and every three color stack (blue, red and green) is the sum of 3 stacks (one for each color) acquired separately in black and white (B/W). Before image analysis, each stack was deconvolved using the AutoDeblur 9.1 function of the AutoQuant software (Troy, N.Y.) and then merged by transforming the three channels corresponding to red (TRITC), blue (DAPI) and green (FITC) into a single three-color stack using the 'RGB merge' command of the ImageJ© software.

Statistical analyses **-** Data are displayed as mean ± standard error of the mean (n = number of cells/experiments). T-tests were used to compare groups showing Gaussian distributions and equal variances. Mann-Whitney rank sum test were used when the variance homogeneity test failed. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

Acknowledgements

This work was supported by the "Ministère de la Recherche et des Technologies", the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (Inserm), a grant from the "Ligue Nationale Contre le Cancer – CGO", and the "Association CANCEN" and supported by "Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro" (AIRC) grant #11348 to SJR. L. Brisson was recipient of a PhD fellowship from the "Région Centre" and a travel grant from the University François-Rabelais of Tours to perform experiments in S.J. Reshkin's lab. 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. We thank Isabelle Domingo and Catherine le Roy for their technical and administrative assistance, respectively. The authors greatly acknowledge the Nikon Imaging Centre @ Institut Curie-CNRS.

References

Allen, D. H., Lepple-Wienhues, A. and Cahalan, M. D. (1997). Ion channel phenotype of melanoma cell lines. J Membr Biol 155, 27-34.

Baumgartner, M., Patel, H. and Barber, D. L. (2004). Na(+)/H(+) exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. Am J Physiol Cell Physiol 287, C844-50.

Black, J. A. and Waxman, S. G. (2012). Sodium channels and microglial function. Exp Neurol 234, 302-15.

Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. and Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. J Biol Chem 279, 26991-7007.

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 NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. Oncogene 30, 2070-6.

Brisson, L., Reshkin, S. J., Gore, J. and Roger, S. (2012). pH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting. Eur J Cell Biol.

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, 3903-15.

Caldieri, G. and Buccione, R. (2010). Aiming for invadopodia: organizing polarized delivery at sites of invasion. Trends Cell Biol 20, 64-70.

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.

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, 1728-40.

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, 1936-42.

Cardone, R. A., Casavola, V. and Reshkin, S. J. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na+/H+ exchanger in metastasis. Nat Rev Cancer 5, 786-95.

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, 8114-26.

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, 7822-32.

Catterall, W. A. (2012). Voltage-Gated Sodium Channels at 60:Structure, Function, and Pathophysiology. J Physiol.

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. J Cell Physiol 210, 469-78.

Diss, J. K., Stewart, D., Fraser, S. P., Black, J. A., Dib-Hajj, S., Waxman, S. G., Archer, S. N. and Djamgoz, M. B. (1998). Expression of skeletal muscle-type voltage-gated Na+ channel in rat and human prostate cancer cell lines. FEBS Lett 427, 5-10.

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, 5381-9.

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+ channel activity. FEBS Lett 569, 191-4.

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, 1427-37.

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.

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, 366-75.

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. Int J Cancer 130, 2013-23.

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+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. Cancer Res 70, 6957-67.

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 Rep 5, 91-6.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-5.

Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhangal, G., Djamgoz, M. B. and Abel, P. D. (1997). Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. Am J Pathol 150, 1213-21.

Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol 17, 107-17.

Linder, S., Wiesner, C. and Himmel, M. (2011). Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. Annu Rev Cell Dev Biol 27, 185-211.

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, 903-20.

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, 7514-22.

Pang, V., Counillon, L., Lagadic-Gossmann, D., Poet, M., Lacroix, J., Sergent, O., Khan, R. and Rauch, C. (2012). On the role of the difference in surface tensions involved in the allosteric regulation of NHE-1 induced by low to mild osmotic pressure, membrane tension and lipid asymmetry. Cell Biochem Biophys 63, 47-57.

Paris, S. and Pouyssegur, J. (1984). Growth factors activate the Na+/H+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H+. J Biol Chem 259, 10989-94.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55, 74-108.

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, 107-11.

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, 3681-95.

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, 774-86.

Stock, C. and Schwab, A. (2009). Protons make tumor cells move like clockwork. Pflugers Arch 458, 981-92.

Tekpli, X., Huc, L., Lacroix, J., Rissel, M., Poet, M., Noel, J., Dimanche-Boitrel, M. T., Counillon, L. and Lagadic-Gossmann, D. (2008). Regulation of Na+/H+ exchanger 1 allosteric balance by its localization in cholesterol- and caveolin-rich membrane microdomains. J Cell Physiol 216, 207-20.

Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Li, Z. et al. (2006). Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. Circulation 114, 2104-12.

Yamaguchi, H. and Oikawa, T. (2010). Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. Oncotarget 1, 320-8.

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, 8594-602.

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 Res Treat.

Yarbrough, T. L., Lu, T., Lee, H. C. and Shibata, E. F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. Circ Res 90, 443-9.

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.

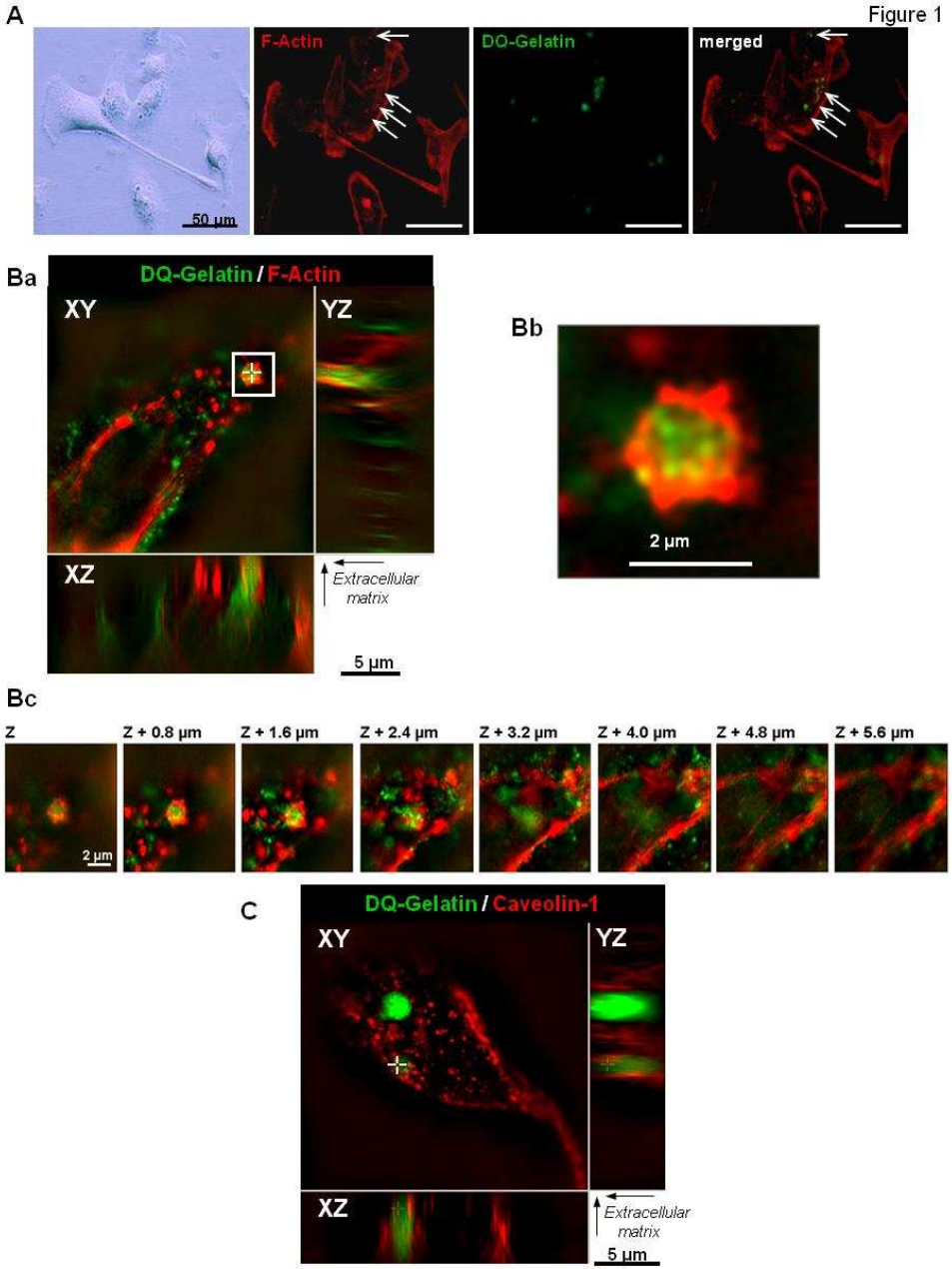


Figure 1: ***Characterization of invadopodia from MDA-MB-231 breast cancer cells.*** Cells were grown for 24 h on a planar matrix of Matrigel™ containing DQ-Gelatin™. **A,** Cells were imaged in phase contrast (first panel) and epifluorescence imaging. F-actin staining with phalloidin-Alexa 594 (second panel, red) showed high density sub-cellular structures (white arrows). DQ-gelatin™ was cleaved in focused areas under the cancer cells (third panel, green) which were close to F-actin condensations (merged image). Scale bar, 10 µm. **B**, Structured Illumination Microscopy (SIM) imaging was used to better visualize invadopodia defined as being dense F-actin circular structures (red) co-localised with *in situ* matrix degradation (green). **Ba**, Image showing an invadopodium in an axial plan (XY) as being a proteolytic spot (green) surrounded by F-actin structures (selected region). YZ and XZ projections from the selected area (white cross) are represented and show the insertion of this protrusive structure into the extracellular matrix. Scale bar, 5 µm. **Bb** represents an enlargement of the invadopodial section selected in Ba. Scale bar, 2 µm. **Bc**, Z-stage representations of XY plane sections taken from the extracellular matrix side to the cell body. The 8 images shown are separated by 0.8 µm step-size in the Z-dimension away from the matrix towards the cell. Scale bar, 2 µm. **C**, SIM imaging showing that proteolytic spots (green) were surrounded by caveolin-1 staining (immunostaining TexasRed, red) in a XY-axial plan as well as in protrusive structures shown in XZ- and YZ-projections from the selected region (white cross). Scale bar, 5 µm.

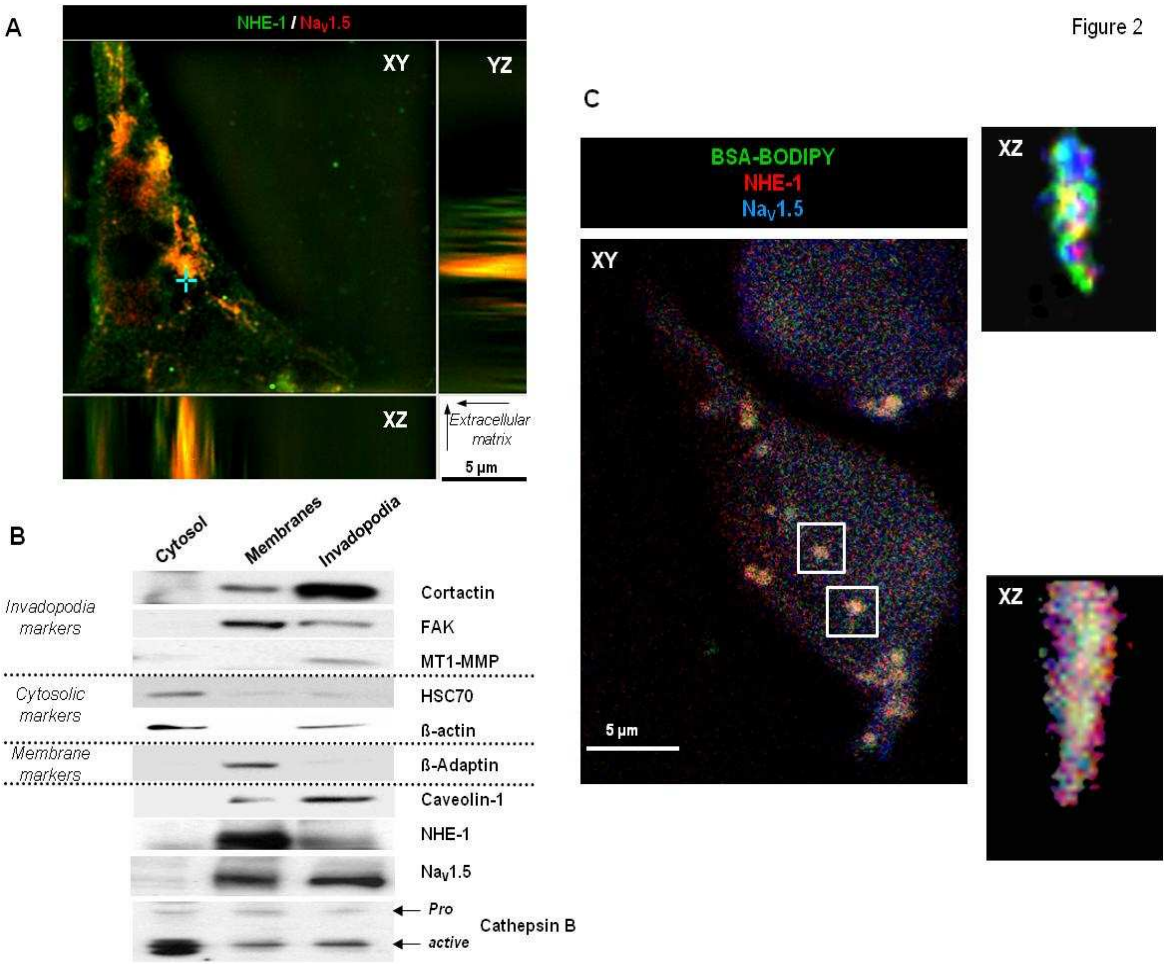


Figure 2

Figure 2: ***Na$_V$1.5 and NHE1 co-localise in MDA-MB-231 breast cancer cells invadopodia.*** **A**, Representative SIM immunofluorescence imaging of NHE-1 (green) and Na$_V$1.5 (red) performed on a MDA-MB-231 breast cancer cell grown on Matrigel™ using primary specific antibodies and showing spots of strong co-localization (XY) corresponding to protrusive structures into the extracellular matrix, as observed with XZ and YZ projections from the selected area (blue cross). Scale bar, 5µm. **B**, Invadopodia entrapped into a 2% gelatin extracellular matrix were fractioned and separated from cytosol- and membrane-enriched fractions. Proteins from the three fractions were analysed by Western Blotting. The quality of the fractions was assessed using invadopodia (cortactin, FAK, MT1-MMP), cytosolic (HSC70, β-actin) and membrane (β-adaptin) markers. The invadopodia fraction showed enrichments in caveolin-1, NHE-1, Na$_V$1.5 and Pro- and active-forms of cathepsin B. (n=5 independent fractionations) **C**, Confocal immunofluorescence imaging of NHE-1 (red) and Na$_V$1.5 (blue) from a MDA-MB-231 cell culture on BSA-BODIPY-FL-containing matrix releasing green fluorescence when degraded. Numerous focal zones of degradation were identified in axial sections (XY) and were co-localised with NHE-1 and Na$_V$1.5. Two matrix degradation

areas were selected and analyzed in sagittal sections (XZ) demonstrating a strong co-localization of NHE-1 and $Na_V1.5$ in protrusive areas of matrix degradation. Scale bar, 5µm.

Figure 3

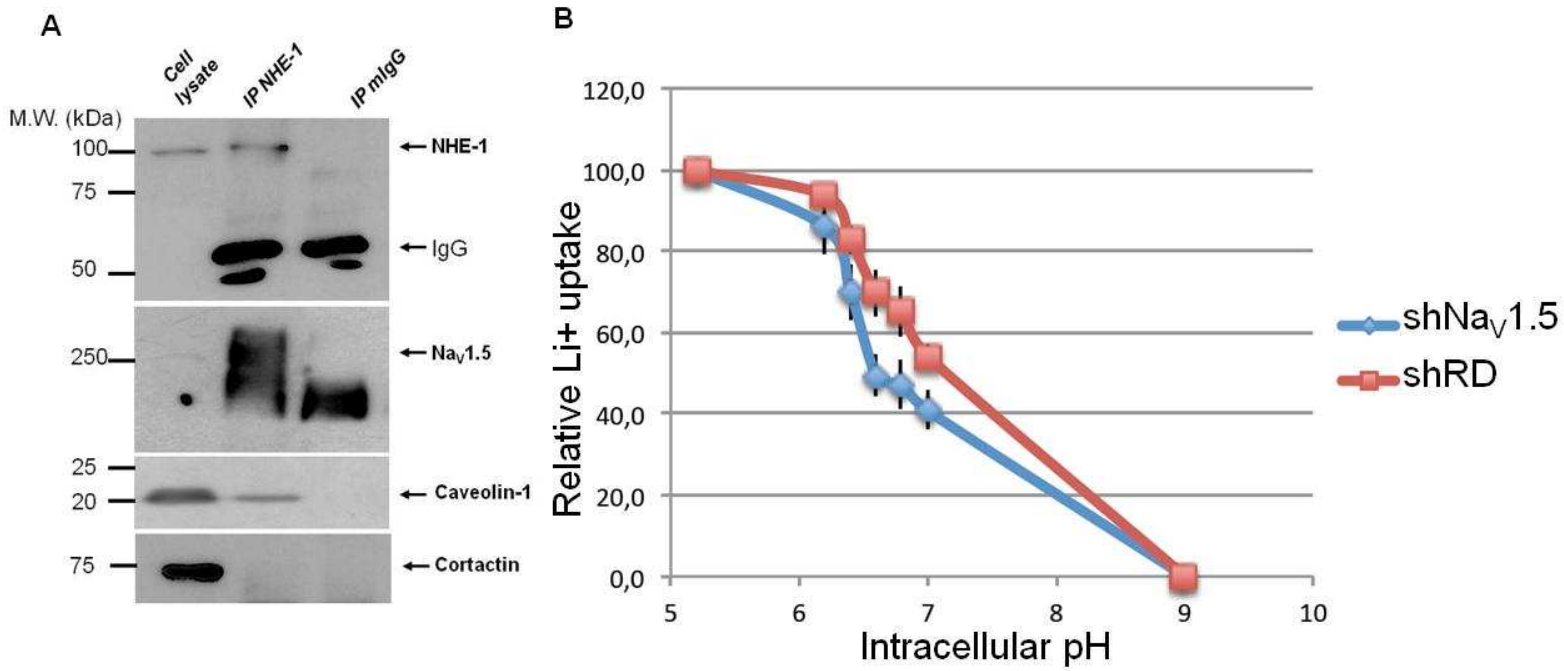


Figure 3: Intimate association between *$Na_V1.5$ and NHE-1 and allosteric modulation of NHE-1 function*. A, NHE-1 exchangers were detected in MDA-MB-231 cell lysates and they were immunoprecipitated (IP NHE-1) with a mouse anti-NHE-1 monoclonal antibody. Anti-mouse immunoglobulin (mIgG) was used as a negative control to rule out non-specific binding in the immunoprecipitation (IP mIgG). $Na_V1.5$ and Caveolin-1 proteins were detected in cell

lysates and co-immunoprecipitates with NHE-1 but not with mIgG. Co-immunoprecipitations shown here are representative of three independent experiments .**B**, Initial rates of the NHE-1 exchanger measured using fast kinetics of Li^+ uptake, showed that expression of $Na_V1.5$ in wt MDA-MB-231 cells (shRD) induced activation of NHE-1 by intracellular protons compared with sh$Na_V1.5$ cells. In shRD cells NHE-1 exchangers are more active at physiological pH than sh$Na_V1.5$ cells. (n=5-9 independent experiments)

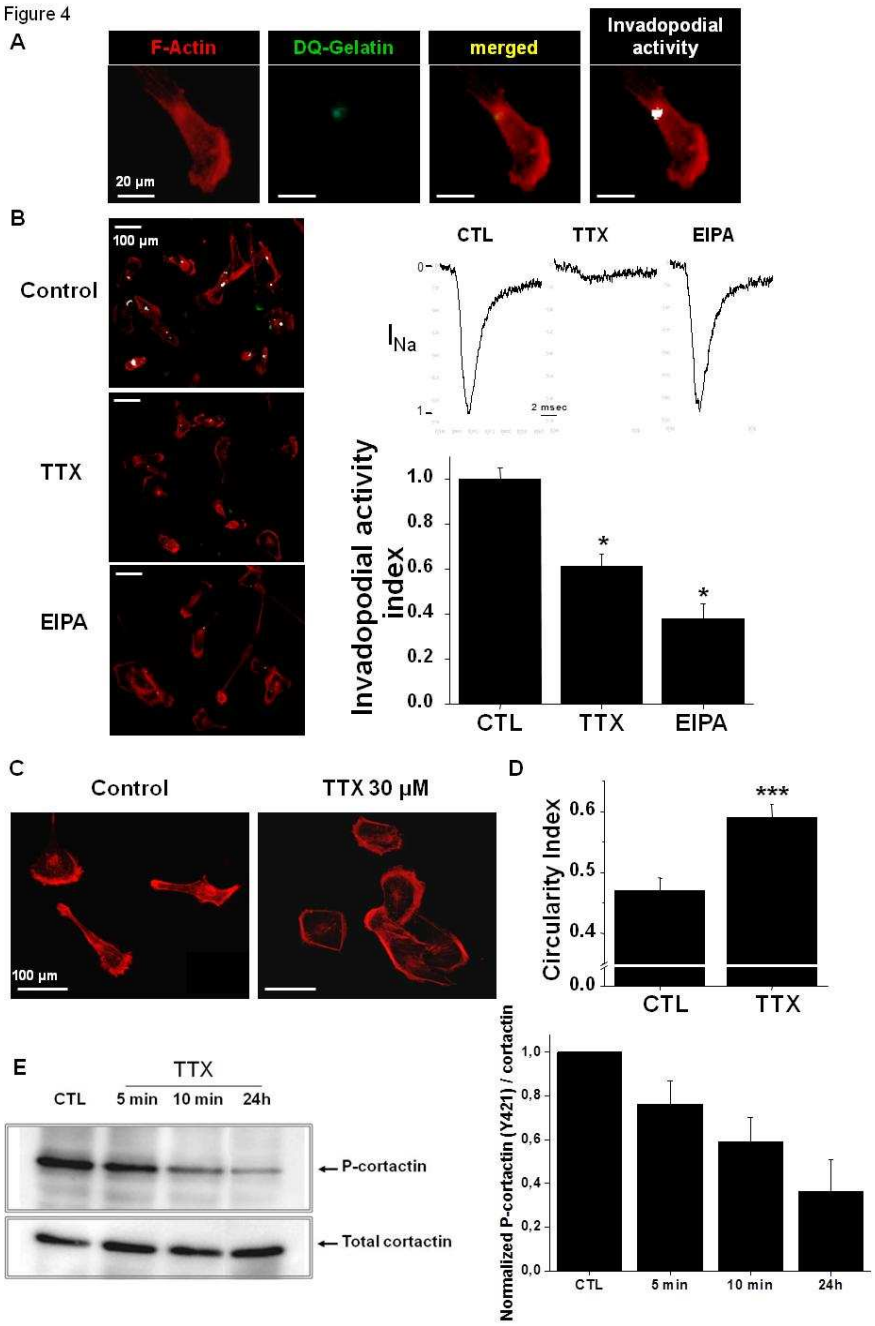


Figure 4: ***$Na_V1.5$ activity controls MDA-MB-231 cell morphology and invadopodial activity.*** **A**, The invadopodial activity from cancer cells cultured on a Matrigel™-composed matrix containing DQ-Gelatin™ was measured using the ImageJ© software and defined as being F-actin foci co-localised with focused proteolytic activities (represented as white pixels). **B**, Invadopodial activities were calculated from cells treated with 30 µM tetrodotoxin (TTX) or 1 µM EIPA or vehicle (control). Representative pictures are shown on the left panel. Scale bar, 100 µm. Number of white pixels were counted to calculate an "Invadopodial activity index" shown in the right panel as a function of treatments. Representative effects of 30 µM TTX and 1 µM EIPA on sodium currents (I_{Na}) recorded from a holding potential of -100 to -5 mV, and normalized to the current recorded in the control condition, are shown above the invadopodial activity index. *, statistically different at $p<0.05$ (Mann-Whitney Rank sum test). **C**, Cells were treated or not (control) with 30 µM TTX, then F-actin cytoskeleton was stained by using phalloidin-Alexa594. Scale bar, 100 µm. **D**, A circularity index was calculated, as indicated in the material and methods section using the ImageJ© software, from untreated (CTL, n= 78) and

TTX-treated cells (n= 51). ***, statistically different at p<0.001 (Student's t-test). Scale bar, 20 µm. **E**, Treating cells with 30 µM TTX induced a decrease in cortactine phosphorylation (Y421) as early as 5 minutes and maintained until 24h. Left shows representative western blotting of 4 independent experiments. Right cortactine phosphorylation quantification using densitometry.

D. Résumé de l'article 2

L'activité du canal sodique dépendant du voltage $Na_V1.5$ exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires invasives MDA-MB-231 permet d'augmenter l'invasivité de ces cellules. Ce canal régule l'invasivité cellulaire par une voie dépendante de l'échangeur sodium-proton (NHE1) et d'une acidification périmembranaire favorable à l'activité de protéases acides. Le rôle des invadopodes, structures cellulaires responsables d'une dégradation focalisée de la matrice extracellulaire, dans ce phénomène a été étudié. L'isolement par une technique biochimique de fractions enrichies en invadopodes a permis de démontrer que NHE1 et $Na_V1.5$ sont retrouvés dans ces fractions, de même pour la cavéoline-1 et la cathepsine à cystéine B. Par des études de microscopie confocale et de microscopie à haute résolution (SIM), il a été montré que NHE1 et $Na_V1.5$ sont co-localisés dans les domaines cellulaires correspondant aux invadopodes et que ces structures contiennent également la cavéoline-1. $Na_V1.5$ et la cavéoline-1 sont co-immunoprécipités avec NHE1 confirmant la proximité entre ces trois protéines. L'étude de l'affinité de NHE1 pour les protons intracellulaires a révélé qu'en présence du canal $Na_V1.5$, la sensibilité de l'échangeur NHE1 aux protons intracellulaires est augmentée conduisant à une plus grande activité de NHE1 au pH intracellulaire des cellules MDA-MB-231. L'inhibition de $Na_V1.5$ modifie la forme des cellules, diminue l'activité de dégradation protéolytique des invadopodes et diminue la phosphorylation de la cortactine, protéine impliquée dans la formation des invadopodes. Cette proximité entre NHE1, $Na_V1.5$ et la cavéoline-1, dans des domaines subcellulaires responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, permettrait l'établissement d'un couplage fonctionnel entre NHE1 et $Na_V1.5$ afin d'induire l'acidification périmembranaire nécessaire à l'augmentation de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires (Figure 44).

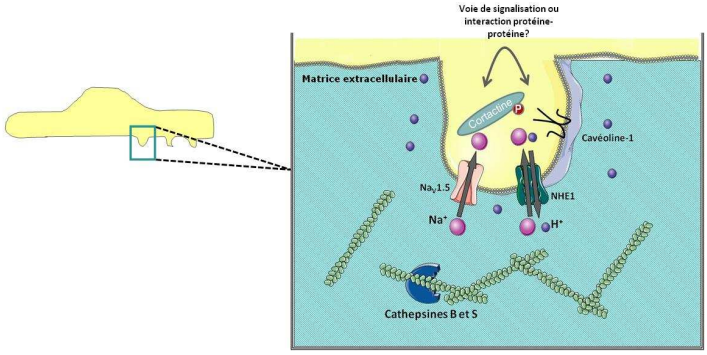


Figure 44 : Schéma hypothétique de la régulation de NHE1 par $Na_V1.5$ dans les invadopodes des cellules cancéreuses MDA-MB-231.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art

E. Discussion

Cette étude a permis une meilleure compréhension du rôle du canal $Na_V1.5$ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires ainsi que de son lien avec l'échangeur sodium-proton NHE1. Ces deux protéines semblent liées fonctionnellement dans des micro-domaines cellulaires spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Le mécanisme permettant cette relation semble impliquer une augmentation de la sensibilité de NHE1 pour les protons intracellulaires bien que ce phénomène ne soit pas encore entièrement défini.

La co-localisation de NHE1 et $Na_V1.5$, mise en évidence dans l'article précédent a été confirmée par l'utilisation de microscopie à haute résolution. Cette technique démontre une proximité importante entre ces deux protéines (Figure 2 de l'article ci-dessus). Une étude récente s'est intéressée à la localisation de la sous-unité α des canaux Na_V dans les cellules MDA-MB-231 et démontre une localisation périnucléaire des canaux Na_V ainsi que dans les lamellipodes. Dans cette étude, les cellules ne sont pas cultivées sur une matrice extracellulaire et ne possèdent donc pas d'invadopodes (Yang *et al.*, 2012).

En plus de leur localisation dans les radeaux lipidiques, NHE1 et $Na_V1.5$ sont situés dans les invadopodes. Cette localisation a été démontrée par deux techniques complémentaires, l'isolement d'une fraction enrichie en invadopodes et la microscopie de fluorescence. La technique biochimique démontre, après contrôle de marqueurs des différentes fractions, que NHE1 est présent dans la fraction enrichie en invadopodes, de même que $Na_V1.5$. Les invadopodes contiennent également la protéase MT1-MMP, des formes actives de la cathepsine B et la cavéoline-1 (Figure 2 de l'article ci-dessus). L'analyse par microscopie confirme la co-localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans des zones membranaires à activité de dégradation protéolytique et se prolongeant dans la matrice extracellulaire (Figure 1 et 2 de l'article ci-dessus). Ces résultats suggèrent que NHE1 et $Na_V1.5$ sont localisés dans les sites responsables de la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses. Leur localisation dans ces domaines pourrait favoriser la création d'un microenvironnement acide à proximité des invadopodes permettant d'activer les cathepsines à cystéine responsables de la dégradation de la matrice. Il apparaît important de pouvoir mesurer le pH extracellulaire autour des invadopodes. Pour cela, une technique développée par l'équipe du Pr. Reshkin pourra être employée (Busco *et al.*, 2010). Cette technique utilise les propriétés de sensibilité au pH de la fluorescéine. L'émission de fluorescence de la DQ-gelatin, substrat de protéases couplé à la fluorescéine, lorsqu'elle est dégradée permet de

mesurer le pH extracellulaire dans ces zones de dégradation. Cette étude démontre que dans les cellules MDA-MB-231, le pH extracellulaire à proximité des invadopodes se situe autour de 6,36 alors que celui autour des cellules est plus alcalin vers 7,43 (Busco *et al.*, 2010). L'influence de l'activité de NHE1 et de $Na_V1.5$ sur le pH extracellulaire des zones de dégradation pourra être mesurée.

NHE1 et $Na_V1.5$ semblent localisées à proximité de régions riches en cavéoline-1. Il a été démontré que les radeaux lipidiques et la cavéoline-1 étaient nécessaires à la formation et à l'activité de dégradation des invadopodes (Caldieri *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009). En effet, les invadopodes sont des zones de membranes riches en cholestérol typiques des radeaux lipidiques. La cavéoline-1, connue pour permettre la formation des caveolae par le transport du cholestérol vers la membrane plasmique, régule la formation des invadopodes en transportant le cholestérol dans ces structures (Caldieri *et al.*, 2009). De plus, il a été proposé un rôle anti-tumoral des statines, inhibant la synthèse du cholestérol (Solomon and Freeman, 2008), ce qui pourrait s'expliquer par une diminution de la fonctionnalité des invadopodes et donc de l'agressivité des cellules cancéreuses. Ces résultats supportent la nécessité d'étudier le rôle des radeaux lipidiques dans la relation entre $Na_V1.5$ et NHE1. Pour cela, les radeaux lipidiques pourront être déstabilisés avec des agents interférants avec la localisation ou la synthèse du cholestérol (statines) ou avec un siRNA spécifique de la cavéoline-1.

Les invadopodes sont enrichis en protéines phosphorylées sur les tyrosines (dont la cortactine), mettant en évidence l'importance de la signalisation cellulaire dans ces structures (Bowden *et al.*, 2006). La localisation de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans les invadopodes pourrait permettre leur rapprochement et favoriser leur interaction. En effet, NHE1, $Na_V1.5$ et la cavéoline-1 co-immunoprécipitent ensemble. Il apparaît nécessaire d'étudier l'influence de la localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les invadopodes sur leur activité. Ces études permettraient de déterminer si la localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans ces micro-domaines cellulaires est nécessaire à leur interaction fonctionnelle. Pour cela, des mesures d'activité de NHE1 et de $Na_V1.5$ pourront être effectuées sur des cellules cultivées sur du Matrigel afin de permettre la formation d'invadopodes comparées à des cellules cultivées sur du verre. Il serait intéressant de déterminer si l'activité de $Na_V1.5$ est plus grande dans les invadopodes que dans les autres zones membranaires. Ces mesures pourront être réalisées par du patch clamp en configuration de canal unitaire, avec des sondes fluorescentes sensibles au potentiel de membrane ou au sodium.

Cette étude sur la localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ dans des domaines subcellulaires impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses reste descriptive mais a permis de nous interroger sur la relation entre NHE1, $Na_V1.5$ et l'invasivité cellulaire. La relation fonctionnelle entre NHE1 et $Na_V1.5$ a été approfondie par des mesures de la sensibilité aux protons intracellulaires de l'échangeur NHE1 en présence d'un shRNA inhibant spécifiquement l'expression de $Na_V1.5$. Les cellules exprimant $Na_V1.5$ ont une sensibilité aux protons intracellulaires augmentée comparée aux cellules sh$Na_V1.5$ ne l'exprimant pas (Figure 3 de l'article ci-dessus). Ces cellules ont donc un échangeur NHE1 plus actif pour un même pH intracellulaire proche de la neutralité conduisant à une activité plus importante de NHE1 lorsque le canal $Na_V1.5$ est actif. Ce mécanisme de régulation de NHE1 par sa sensibilité aux protons intracellulaires à déjà été mis en évidence lors de la stimulation de cellules par des mitogènes (Lacroix *et al.*, 2004; Paris and Pouyssegur, 1984) ou lors d'une déplétion en sérum (Reshkin *et al.*, 2000a).

L'activité de NHE1 et $Na_V1.5$, est nécessaire à la fonction de dégradation de la matrice extracellulaire par les invadopodes. L'inhibition de NHE1 ou de $Na_V1.5$ diminue l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire par les invadopodes suggérant que l'activité de ces protéines est nécessaire au fonctionnement des invadopodes (Figure 4 de l'article ci-dessus). NHE1 et $Na_V1.5$ pourraient également jouer un rôle dans la formation des invadopodes. Dans les cellules MDA-MB-231, NHE1 est connu pour être située dans les invadopodes et pour participer à l'acidification extracellulaire du microenvironnement cellulaire et à l'activité de dégradation des invadopodes. Son inhibition réduit la formation des invadopodes (Busco *et al.*, 2010). De plus, une récente étude, a démontré que les protons transportés par NHE1 en dehors de la cellule et par conséquent l'alcalinisation intracellulaire sont nécessaires à la polymérisation de l'actine par la cofiline et à la formation des invadopodes (Magalhaes *et al.*, 2011). La formation des invadopodes implique la phosphorylation de la cortactine qui recrute NHE1 au niveau des précurseurs d'invadopodes. L'alcalinisation induite par NHE1 permet de détacher la cofiline de la cortactine et d'induire la polymérisation de l'actine permettant ainsi l'élongation des invadopodes (Magalhaes *et al.*, 2011). L'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ par la TTX induit une diminution de la quantité de cortactine phosphorylée sur la tyrosine 421 dès 5 minutes de traitement, cette diminution étant maintenue après 24h de traitement (Figure 4 de l'article ci-dessus). Ces résultats suggèrent que l'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait favoriser la formation des invadopodes par une augmentation de la phosphorylation de la cortactine. La phosphorylation de la cortactine pourrait induire le

recrutement de NHE1 et l'augmentation de son activité pour stimuler la formation des invadopodes et augmenter l'invasivité cellulaire. Ces résultats ne permettent pas de déterminer si l'effet de la TTX est dû à l'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ ou à la diminution de l'activité de NHE1. Pour cela, ces mêmes mesures de phosphorylation de la cortactine lorsque NHE1 et $Na_V1.5$ sont inhibés doivent être effectuées. L'étude du rôle de la cortactine dans la relation entre NHE1 et $Na_V1.5$ doit être poursuivie par des études de co-localisation et d'interaction entre NHE1, $Na_V1.5$ et la cortactine phosphorylée ou non. L'effet de l'inhibition d'expression de la cortactine par un siRNA pourra également être évalué sur l'activité de NHE1. La phosphorylation de la cortactine sur la tyrosine 466 est également impliquée dans la formation des invadopodes (Oser *et al.*, 2010). L'effet de la TTX sur la phosphorylation de cette tyrosine devra être étudié.

Les invadopodes se forment en plusieurs étapes qui impliquent de nombreuses protéines mais les mécanismes précis de leur formation ne sont pas encore entièrement compris (Murphy and Courtneidge, 2011). Lors de l'étape d'initiation, des contacts focaux se forment avec la matrice extracellulaire. L'initiation est suivie par l'étape de formation qui se produit par le recrutement, l'activation et la phosphorylation de protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine et à l'élongation de l'invadopode telles que le complexe Arp2/3, WIP (WASP interacting protein), la cortactine, TKS5 (substrat de la tyrosine kinase src), la fascin ou encore AFAP110 (actine filament-associated protein). Lors de la dernière étape de maturation, les protéases nécessaires à l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire sont adressées aux invadopodes. La sécrétion de MMP2 et MMP9 dans l'environnement extracellulaire est stimulée ainsi que le recrutement de MT1-MMP à la surface des invadopodes probablement par une voie dépendante des microtubules (Linder *et al.*, 2011; Poincloux *et al.*, 2009). 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). L'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait stimuler l'invasivité cellulaire par une augmentation de la formation et de l'activité des invadopodes par une voie dépendante de NHE1. Dans les macrophages, $Na_V1.5$ régule l'acidification et le transport des vésicules intracellulaires (Carrithers *et al.*, 2007). $Na_V1.5$ pourrait donc réguler la formation des invadopodes par la stimulation du transport vésiculaire vers les invadopodes. Une autre isoforme, $Na_V1.6$ est localisée dans les podosomes de macrophages et les invadopodes de cellules de mélanome où elle participe à la formation de ces structures et à l'invasivité des cellules (mais pas à la migration) (Carrithers *et al.*, 2009).

La localisation des canaux Na_V dans les invadopodes pourrait être un des mécanismes permettant d'expliquer le rôle de ce canal dans l'invasivité des cellules non excitables. Afin de confirmer le rôle de $Na_V1.5$ et NHE1 dans la formation des invadopodes, les différentes étapes décrites pour la formation des invadopodes devront être étudiées par la mesure du recrutement ou de la phosphorylation de ces protéines.

Notre étude met en évidence une co-localisation entre NHE1 et $Na_V1.5$ dans des micro-domaines cellulaires spécialisés dans la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire. De plus, $Na_V1.5$ et NHE1 co-immunoprécipitent suggérant une forte proximité entre ces protéines. Cette co-immunoprécipitation, n'implique pas nécessairement une interaction directe mais peut comprendre des protéines intermédiaires. NHE1 et $Na_V1.5$ sont connus pour posséder de nombreux partenaires protéiques et se situer dans des macro-complexes protéiques. L'actine, connue pour être associée à ces deux protéines pourrait être un intermédiaire entre NHE1 et $Na_V1.5$. En présence d'un inhibiteur du canal $Na_V1.5$, les cellules MDA-MB-231 deviennent plus circulaires, suggérant que le cytosquelette d'actine est modifié par l'activité du canal $Na_V1.5$ (Figure 4 de l'article ci-dessus). $Na_V1.5$ est connu pour être lié au cytosquelette d'actine, en effet, un traitement de myocytes cardiaques avec de la cytochalasine D, qui inhibe la polymérisation de l'actine, réduit le courant sodique dépendant du voltage et diminue la cinétique d'inactivation du courant (Undrovinas *et al.*, 1995). De même, NHE1 est lié au cytosquelette d'actine, par les protéines de la famille ERM (Denker *et al.*, 2000). La cofiline, protéine jouant un rôle dans la dynamique de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine, présente une activité augmentée à pH_i alcalin (Frantz *et al.*, 2008). Cette protéine est impliquée dans la formation des invadopodes par une voie dépendante du pH intracellulaire (Magalhaes *et al.*, 2011). Des résultats préliminaires indiquent que l'inhibition du canal $Na_V1.5$ pourrait augmenter la polymérisation de l'actine et que la diminution de la polymérisation de l'actine augmente l'efflux de protons par NHE1 (Figure 45). Ces résultats suggèrent que l'activité du canal $Na_V1.5$ diminue la polymérisation de l'actine et cette diminution pourrait augmenter l'activité d'efflux de protons de NHE1. Ceci est en accord avec la démonstration précédemment faite de l'augmentation d'activité de NHE1 par l'activité du canal $Na_V1.5$. Bien qu'à compléter, ces résultats renseignent sur la quantité totale d'actine polymérisée or il n'est pas exclu une dynamique différente entre polymérisation et dépolymérisation de l'actine dans des zones particulières telles que les invadopodes.

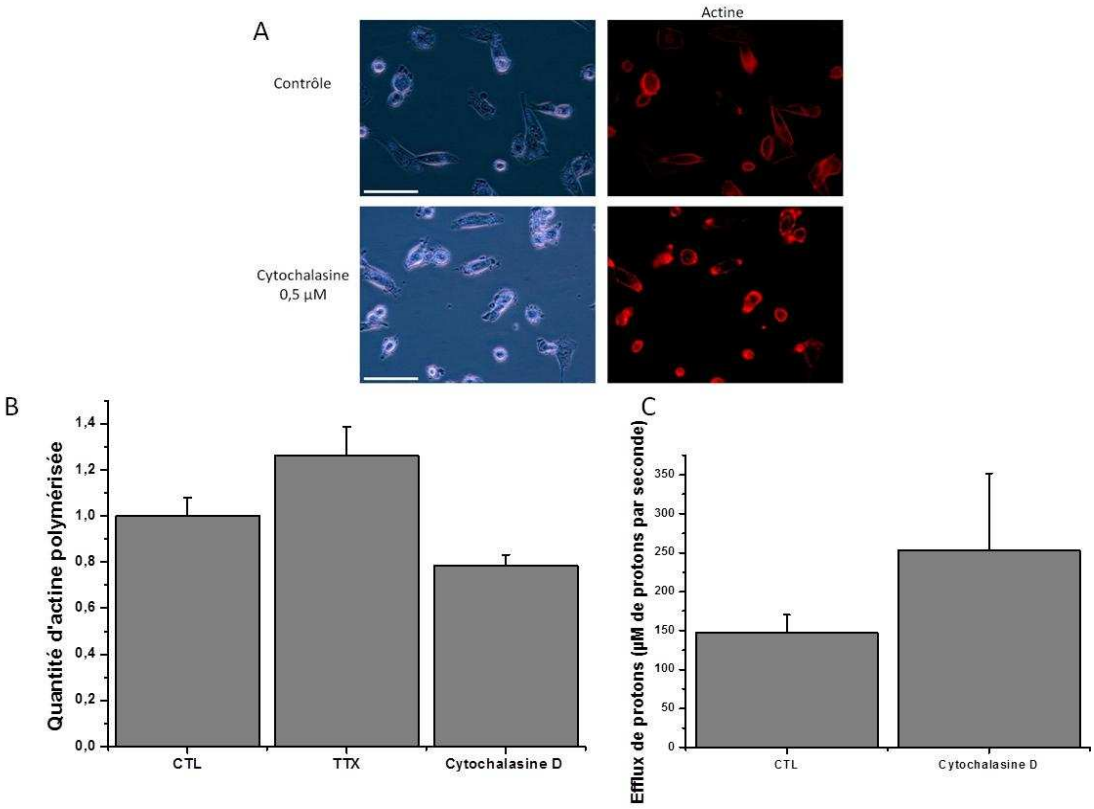


Figure 45 : Rôle de la polymérisation de l'actine dans l'effet du canal $Na_V1.5$ sur l'activité de NHE1.

A. Les cellules traitées par 0,5 µM de cytochalasine présentent une déstabilisation de leur cytosquelette d'actine. B. Mesure de la quantité de F-actine en présence d'un inhibiteur de l'activité de $Na_V1.5$ (TTX 30 µM pendant 24h) ou de la polymérisation de l'actine (cytochalasine D 0,5 µM pendant 30 minutes) (n = 5 *P* = 0,10 pour TTX vs CTL et 0,09 pour cytochalasine D vs CTL). C. Efflux de protons en présence ou non de 0,5 µM de cytochalasine D pendant 30 minutes (n = 3, *P* = 0,19).

La poursuite de cette étude sur l'implication de la polymérisation de l'actine dans la régulation de l'invasivité des cellules MDA-MB-231 par $Na_V1.5$ et NHE1 semble nécessaire à une meilleure compréhension de ce mécanisme. La polymérisation de l'actine peut être mesurée plus finement à l'aide d'un peptide qui n'interfère pas avec la polymérisation (LifeAct) permettant donc une visualisation en temps réel, sur des cellules non fixées, de la dynamique du cytosquelette d'actine (Riedl *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'activation de NHE1 lors d'une déplétion en sérum induit une diminution de la polymérisation d'actine qui réduit la formation des fibres de stress et augmente la formation de pseudopodes favorisant ainsi la migration et l'invasivité cellulaire (Paradiso *et al.*, 2004). La diminution de la quantité d'actine polymérisée par l'inhibition de l'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait donc être due à l'inhibition de NHE1. L'activité d'une autre isoforme, NHE3 est connue pour être diminuée

en présence de cytochalasine alors que dans ce modèle, différent du notre, l'activité de NHE1 ne semble pas être modifiée par cet agent (Kurashima *et al.*, 1999). Des mesures en présence d'inhibiteurs de ces deux protéines individuellement et simultanément doivent être effectuées afin de déterminer le rôle de leur activité respective sur la polymérisation de l'actine dans les cellules MDA-MB-231.

Lors de cette étude, nous avons démontré une proximité importante entre NHE1 et $Na_V1.5$. Ces deux protéines sont situées dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231 et participent à leur activité de dégradation de la matrice extracellulaire. NHE1 et $Na_V1.5$ étant connues pour être des protéines interagissant avec de nombreuses autres protéines, l'existence de complexes multi-protéiques dédiés à l'invasivité cellulaire est envisageable. L'existence d'un tel complexe pourra être étudiée par des gels d'acrylamide en condition non dénaturante ou des expériences de cross-linking. La technique de cross-linking a été initiée pendant cette thèse sans résultats probants pour le moment. Des résultats préliminaires de gels en condition non dénaturante suggèrent que NHE1 et $Na_V1.5$ pourraient être situés dans des complexes protéiques de 388 et 330 kDa (Figure 46).

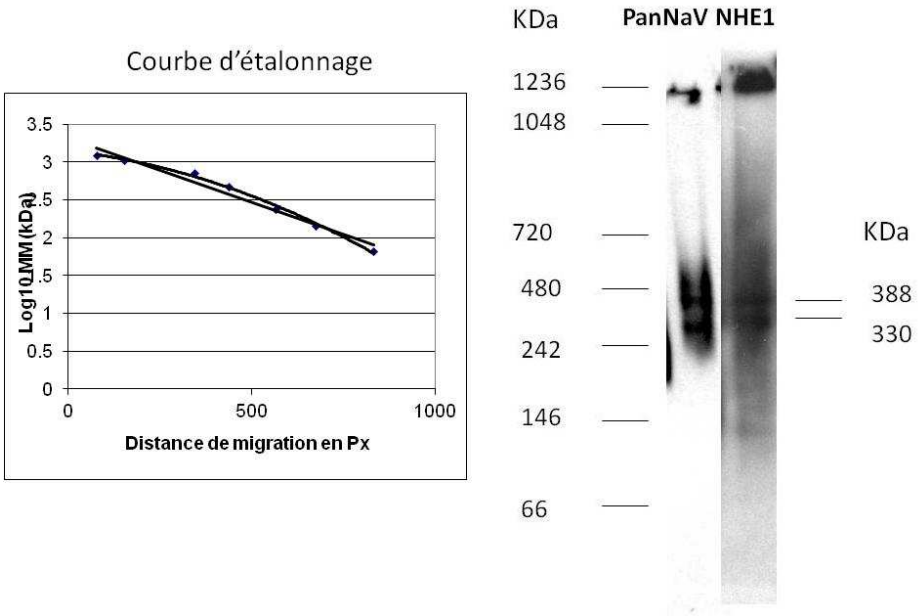


Figure 46 : Identification de complexes protéiques par électrophorèse en condition non dénaturante. n=2

La spécificité de ces complexes protéiques est à vérifier dans des cellules n'exprimant pas NHE1 ou $Na_V1.5$. Les résultats obtenus par des gels natifs pourront être confirmés par une

technique de gel filtration (chromatographie par exclusion de taille) (Bloustine *et al.*, 2003; Naudin *et al.*, 2010). Pour cela, un lysat protéique est déposé sur une colonne permettant de séparer les protéines et les complexes protéiques selon leur masse moléculaire. La révélation par western blotting des protéines contenues dans les différentes fractions permet de déterminer si ces protéines sont associées ou non. L'entrée de sodium par le canal $Na_V1.5$ pourrait permettre la création d'une zone cellulaire où la concentration de sodium est plus importante et favoriser l'établissement d'une signalisation permettant d'augmenter l'activité de NHE1 situé dans ces mêmes zones cellulaires.

Le mécanisme permettant à l'activité du canal $Na_V1.5$ de réguler l'efflux de protons par NHE1 semble impliquer une augmentation de l'affinité de NHE1 pour les protons intracellulaires par un mécanisme encore inconnu. Puisque l'activité du canal est nécessaire pour stimuler NHE1, un rôle de la protéine $Na_V1.5$ autre que celui de pore peut être exclu. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer le rôle de l'activité du canal $Na_V1.5$ sur NHE1 : soit une interaction directe entre ces deux protéines soit l'implication d'intermédiaires. Dans le cas d'une interaction directe, un changement de la conformation du canal lorsqu'il laisse passer du sodium pourrait activer l'échangeur NHE1 pour augmenter l'acidification extracellulaire. Cette hypothèse est peu probable puisqu'en présence de TTX les changements de conformation lors de l'activation sont toujours possibles, cette toxine bloquant le passage du sodium dans le pore (Fozzard and Lipkind, 2010) or un effet de la TTX a été démontré sur l'activité de NHE1. Dans le cas d'une interaction indirecte, des protéines intermédiaires pourraient faire le lien entre l'activité du canal $Na_V1.5$ et celle de NHE1. Ces intermédiaires peuvent impliquer des protéines d'interaction ou des protéines de signalisation activées par l'activité du canal $Na_V1.5$ et capables de réguler celle de NHE1. Pour ces deux possibilités, la co-localisation entre NHE1 et $Na_V1.5$ pourrait permettre de favoriser leur interaction.

Conclusions et perspectives

Le traitement des cancers est un enjeu majeur de santé publique. Les cellules cancéreuses sont capables d'acquérir de nombreuses propriétés leur permettant de former une tumeur. Ces cellules peuvent proliférer et se développer dans l'environnement hostile de la tumeur, faiblement alimentée en oxygène et en nutriments par les vaisseaux sanguins. Cependant la principale cause de décès par cancer du sein n'est pas la tumeur primaire, qui généralement peut régresser par des traitements anti-tumoraux ou être retirée relativement aisément par chirurgie, mais la généralisation de la pathologie par le développement de métastases. Il apparaît donc essentiel de mieux comprendre les déterminants cellulaires et moléculaires du processus métastatique afin de pouvoir le traiter ou le prévenir.

Les cellules cancéreuses mammaires très invasives MDA-MB-231 expriment un canal sodique dépendant du voltage, $Na_V1.5$. Cette isoforme est exprimée majoritairement dans les cellules cardiaques où elle participe à l'excitabilité cellulaire. Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'expression de ce canal est favorable à l'agressivité des cellules *in vitro* (Gillet *et al.*, 2009; Roger *et al.*, 2003) et semble corrélée au développement des métastases et à une diminution de la survie des patientes (Fraser *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012). Son inhibition apparaît donc comme une possibilité thérapeutique afin de réduire la formation des métastases (Yang *et al.*, 2012) à la condition que les fonctions cardiaques et nerveuses ne soient pas affectées. L'expression de canaux Na_V n'est pas limitée aux cellules cancéreuses mammaires puisqu'ils sont retrouvés dans d'autres types de cancers où ils participent également à l'invasivité cellulaire. Ce phénomène semble donc ne pas dépendre du modèle étudié mais être généralisable à plusieurs types cancéreux bien que les isoformes de Na_V exprimées soient différentes. Peu de choses sont connues sur les causes de l'expression des canaux sodiques dépendants du voltage dans les cellules cancéreuses. Les mutations retrouvées dans les oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs pourraient augmenter leur transcription ou induire des modifications épigénétiques favorisant leur expression. Une piste pourrait être l'activation des facteurs de transcription lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Bien que les causes de l'expression des canaux Na_V dans les cellules cancéreuses soient inconnues, leur rôle, quelle que soit l'isoforme, dans l'invasivité des cellules cancéreuses est désormais admis.

Le rôle des canaux sodiques dépendants du voltage a été étudié dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 exprimant l'isoforme $Na_V1.5$. L'activité de ce canal

induit une acidification extracellulaire qui est favorable à l'activité des protéases actives à pH acide, les cathepsines à cystéine B et S permettant ainsi d'augmenter l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires (Gillet *et al.*, 2009). L'objectif de cette thèse était donc d'étudier la régulation du pH des cellules MDA-MB-231 et de mieux comprendre le mécanisme par lequel le canal $Na_V1.5$ induit cette acidification extracellulaire.

Lors de ce travail, nous avons démontré que l'échangeur sodium-proton NHE1, essentiel pour la régulation du pH_i des cellules MDA-MB-231, pouvait être responsable de l'acidification périmembranaire induite par l'activité du canal $Na_V1.5$. En effet, l'activité du canal $Na_V1.5$ (et pas seulement la présence de la protéine) augmente l'activité d'efflux de protons de NHE1 en augmentant sa sensibilité pour les protons intracellulaires. De plus, NHE1 et $Na_V1.5$ semblent participer à une même voie favorisant l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires. Ces deux protéines sont retrouvées co-localisées dans les radeaux lipidiques et dans des domaines membranaires spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses, les invadopodes. L'utilisation de microscopie à haute résolution a permis de confirmer cette proximité entre NHE1 et $Na_V1.5$. Cette dernière observation de la proximité de NHE1 et $Na_V1.5$ nous a conduits à postuler qu'ils pouvaient faire partie de macro-complexes protéiques dédiés à l'invasivité cellulaire. En effet, NHE1 et $Na_V1.5$ sont connus pour posséder de nombreux partenaires protéiques et être finement régulés (Baumgartner *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2009). Cette proximité entre NHE1 et $Na_V1.5$ pourrait favoriser leur interaction fonctionnelle de manière à ce que l'activité de $Na_V1.5$ stimule celle de NHE1. L'existence de cette localisation précise de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les zones spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et donc dans l'invasivité cellulaire est en faveur d'une régulation extrêmement précise du pH dans ces zones de dégradation. La formation d'un complexe protéique incluant $Na_V1.5$ et NHE1 dans les invadopodes pourrait conduire à une acidification extracellulaire localisée de l'environnement cellulaire où les protéases sont sécrétées et concentrées. Des enzymes du métabolisme glycolytique ont été identifiées dans les invadopodes suggérant que les protons nécessaires à l'activité de NHE1 sont produits directement dans les structures invasives où NHE1 est exprimée (Attanasio *et al.*, 2011). De plus, la cavéoline-1 stimule la glycolyse aérobie de cellules de cancer colorectal (Ha *et al.*, 2012).

L'étude du rôle de l'activité du canal $Na_V1.5$ sur l'activité de NHE1 dans les invadopodes et sur l'acidification du pH extracellulaire autour des invadopodes est d'une grande importance pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés à l'activité du canal

$Na_V1.5$. Pour cela, des mesures de pH extracellulaire et intracellulaire doivent être effectuées au niveau des invadopodes en présence ou non d'inhibiteurs pharmacologiques et de siRNA spécifiques. Le rôle de la présence de ces protéines dans les invadopodes pourra être étudié par des mesures d'activité de NHE1 et de $Na_V1.5$ dans des cellules cultivées sur du Matrigel permettant la formation d'invadopodes.

Les résultats préliminaires obtenus par des gels d'acrylamide en condition non dénaturante sont un argument en faveur d'un complexe protéique composé de $Na_V1.5$ et NHE1. Ces résultats doivent être confirmés puis approfondis par l'identification d'autres protéines éventuellement situées dans ces complexes telles que des protéines d'interaction ou de lien au cytosquelette. Les études de co-immunoprécipitation permettraient également d'identifier les partenaires protéiques de NHE1 et $Na_V1.5$ dans les cellules MDA-MB-231. En effet, des intermédiaires d'interaction protéique ou du cytosquelette semblent être des pistes prometteuses pour expliquer le lien entre NHE1 et $Na_V1.5$. Une étude s'intéressant à l'effet de l'activité d'un canal sodique dépendant du voltage sur la morphologie de cellules cancéreuses prostatiques a proposé que l'activité du canal permet un changement de morphologie des cellules responsable de l'augmentation de leur invasivité (Fraser *et al.*, 1999). Dans cette étude, les cellules où le courant sodique dépendant du voltage est inhibé par la TTX sont moins allongées et possèdent des prolongements cellulaires plus courts et moins larges. Nous avons également observé une augmentation de la circularité des cellules lors de l'inhibition du canal $Na_V1.5$ par la TTX. L'activité du canal pourrait donc favoriser la mise en place d'une morphologie cellulaire spécialisée dans l'invasivité par une modification du cytosquelette d'actine en induisant par exemple la formation des invadopodes. La poursuite de l'étude de la dynamique de polymérisation de l'actine est donc essentielle pour mieux comprendre ce phénomène. De même l'étude du rôle de $Na_V1.5$ et NHE1 sur la formation des invadopodes apparait comme nécessaire. L'activité du canal $Na_V1.5$ pourrait en stimulant l'efflux de protons de NHE1 induire une réorganisation du cytosquelette d'actine favorisant la formation des invadopodes et ainsi l'invasivité des cellules cancéreuses. L'étude initiée sur la phosphorylation de la cortactine devra être poursuivie par l'étude d'autres protéines nécessaires à la formation des invadopodes avec éventuellement l'implication de voies dépendantes du sodium.

La composition et la forme des invadopodes et des structures associées que sont les podosomes est de mieux en mieux connue et de nombreuses protéines ont été identifiées comme présentes dans ces structures (Linder *et al.*, 2011). Certaines de ces protéines

pourraient être des partenaires protéiques pour NHE1 et $Na_V1.5$ ou des intermédiaires telles que l'ezrin (Kocher *et al.*, 2009), la gelsoline dont l'activité est sensible au pH (Attanasio *et al.*, 2011; Litwin *et al.*, 2012), 14-3-3 (identifiée comme interagissant avec NHE1 et $Na_V1.5$) (Attanasio *et al.*, 2011) ou encore ERK1/2 (Badowski *et al.*, 2008).

Toutefois, ces résultats obtenus dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 pourraient être généralisés dans d'autres modèles de cellules cancéreuses (prostate, poumon, colon, col de l'utérus). Les cellules MDA-MB-231 constituent un modèle de cancer du sein « triple négatif » (ER^-, PR^-, $HER2^-$) très agressif que les traitements actuels peuvent difficilement cibler. Ces résultats devront donc être confirmés dans d'autres modèles de cancers agressifs, d'autant plus que l'expression de canaux sodiques dépendants du voltage est retrouvée dans d'autres types de cancers. Le rôle de la régulation du pH dans l'invasivité de ces autres types de cancers n'est pas connu et pourra faire l'objet de nouvelles études. L'étude de la régulation du pH et de la régulation de l'activité de NHE1 par l'activité d'un canal sodique dépendant du voltage pourra donc être reproduite dans ces modèles de cancers invasifs ainsi que l'étude du lien entre la régulation du pH et l'invasivité cellulaire dépendante des canaux Na_V. De même, la localisation des protéines identifiées et leur rôle dans les domaines membranaires spécifiques que sont les radeaux lipidiques et les invadopodes devront être étudiés afin de généraliser ce phénomène.

La quantité de sodium intracellulaire de cellules de cancer du poumon non à petites cellules est plus importante que dans des cellules non cancéreuses ne possédant pas de canaux sodiques dépendants du voltage (Roger *et al.*, 2007). Ces résultats confirment l'existence d'une entrée de sodium dans des cellules cancéreuses et il apparaît nécessaire d'effectuer des mesures de sodium intracellulaire dans les cellules MDA-MB-231. Celles-ci accompagnées par des mesures de potentiel de membrane permettraient de valider notre hypothèse selon laquelle les canaux sodiques dépendants du voltage induisent une entrée de sodium faible mais continue dans les cellules cancéreuses. Il pourrait exister des domaines cellulaires précis ou l'activité de $Na_V1.5$ est très localisée et n'influe pas sur la quantité de sodium global de la cellule. L'utilisation d'une sonde sensible au sodium (SBFI, sodium Green) couplée à de la microscopie permettra d'identifier finement les variations de sodium dues à l'activité du canal $Na_V1.5$ dans des domaines subcellulaires précis. Il apparait également nécessaire de vérifier que le rôle des canaux Na_V sur l'invasivité des cellules cancéreuses implique bien une entrée de sodium et non un effet de charges. Pour cela, le sodium du milieu extracellulaire pourra être substitué par différents ions. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont le plus

souvent basés sur l'utilisation de TTX pour inhiber l'activité d'entrée de sodium du canal $Na_V1.5$ mais pourraient être complétés par l'étude réciproque de l'augmentation du courant de fenêtre par un inhibiteur de l'inactivation du courant, tel que la vératridine.

Afin d'étudier plus facilement la relation entre NHE1 et $Na_V1.5$ il est envisagé de créer un modèle de surexpression de ces deux protéines dans des fibroblastes. Nous disposons d'une lignée de fibroblastes de hamster dépourvus de NHE1 (lignée dérivée de CCL39) exprimant ou non NHE1 humain (don du Pr. Counillon) et de plasmides du canal $Na_V1.5$ ainsi que de différentes mutations (don du Dr. Guicheney). La transfection de $Na_V1.5$ ou de ces différents mutants dans les fibroblastes exprimant NHE1 permettrait de confirmer leur interaction fonctionnelle et d'étudier le rôle de canaux mutants. Des études préliminaires ont été réalisées et seront poursuivies (stage de Master 2). De plus, ces constructions permettraient l'étude de l'expression du canal $Na_V1.5$ dans des cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives telles que les cellules MCF-7 et de déterminer si cette expression augmente leur invasivité. Enfin, le rôle du canal $Na_V1.5$ dans le développement tumoral et la formation de métastases dans un modèle de greffes orthotopiques chez la souris est en cours d'étude (thèse V. Driffort).

De nouvelles techniques ont été développées récemment pour mimer au mieux les conditions de développement des métastases retrouvées dans les tumeurs. Ces techniques peuvent utiliser des membranes basales natives ou des cultures en trois dimensions (Schoumacher *et al.*, 2011). Elles ont permis de démontrer l'existence d'invadopodes et de podosomes dans des matrices en trois dimensions proches de l'environnement des tissus. Leur identification *in vivo,* initiée depuis quelques années, n'est pas encore clairement établie et est en cours d'étude par de nombreuses équipes. De telles structures ont été identifiées *in vivo* dans les leucocytes lors de leur migration à travers les vaisseaux sanguins vers les tissus (diapédèse). Lors de la diapédèse transcellulaire, les leucocytes utilisent des structures apparentées à des invadosomes pour identifier les zones où leur passage est possible (Carman, 2009). Les cellules endothéliales forment également des podosomes qui pourraient être impliqués dans le remodelage des vaisseaux (Rottiers *et al.*, 2009). Ces structures sont retrouvées dans les cellules musculaires lisses (Quintavalle *et al.*, 2010) et dans les macrophages (Van Goethem *et al.*, 2011) et sont impliquées dans la migration de ces cellules. Des structures proches des invadopodes ont été observées sur des cellules cancéreuses cultivées dans des matrices en trois dimensions (Lizarraga *et al.*, 2009; Magalhaes *et al.*, 2011; Wolf and Friedl, 2009). Des différences existent entre les structures observées probablement à cause de l'utilisation de

matrices différentes ce qui peut influencer le mode de migration des cellules. Certaines preuves sont apparues concernant l'implication de protéines associées aux invadopodes dans l'invasivité des cellules cancéreuses *in vivo*. L'expression de la protéine AMAP, retrouvée dans les invadopodes, est corrélée à l'agressivité des tumeurs et à la formation de métastases (Onodera *et al.*, 2005). La cortactine et tks5, protéines retrouvées dans les invadopodes sont également associées à la croissance tumorale (Blouw *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2009). Les tyrosines kinases Arg et Syc ainsi que N-WASP régulant la formation des invadopodes sont associées à la formation des métastases *in vivo* (Gil-Henn *et al.*, 2012; Gligorijevic *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2009). La première démonstration de protrusions similaires à des invadopodes *in vivo* a été faite très récemment dans un modèle de tumeurs mammaires (Gligorijevic *et al.*, 2012). Les structures observées sur des sections de tumeurs sont composées d'actine F, de cortactine et de N-WASP et sont associées à une dégradation du collagène (Gligorijevic *et al.*, 2012). L'observation de la localisation de NHE1 et $Na_V1.5$ *in vivo* dans des coupes de tumeurs mammaires est nécessaire afin d'identifier si ces protéines sont localisées dans des protrusions de type invadopodes. De même la corrélation entre l'expression de NHE1 et $Na_V1.5$ avec l'agressivité des tumeurs pourra être étudiée.

Des agents pharmacologiques modulateurs de canaux Na_V sont actuellement utilisés en clinique tels que des anti-arythmiques ou des anesthésiques locaux (phenytoïne, mexiletine, lidocaine) et pourraient être utilisés pour prévenir ou inhiber le développement de métastases à la condition que ces agents n'interfèrent pas avec les fonctions cardiaques et neuronales. Des agents spécifiques de l'isoforme $Na_V1.5$ néonatale pourraient diminuer ces risques et bloquer spécifiquement les canaux $Na_V1.5$ exprimés au niveau des cellules cancéreuses mammaires et pas les canaux cardiaques. Des molécules activées par un pH acide permettraient de cibler l'environnement tumoral comme il a été proposé pour inhiber la V-ATPase (De Milito *et al.*, 2010). De plus, le ciblage de ces protéines membranaires est facilité par leur présence au niveau des membranes plasmiques.

En conclusion, lors de cette thèse, le rôle du canal sodique dépendant du voltage $Na_V1.5$ dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires a été étudié. L'activité de ce canal permet d'augmenter l'efflux de protons vers le microenvironnement extracellulaire via NHE1 favorisant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire par les cathepsines à cystéines B et S. Les deux protéines membranaires $Na_V1.5$ et NHE1 sont localisées dans des micro-domaines cellulaires spécialisés dans la dégradation de la matrice extracellulaire et pourraient se situer dans des complexes protéiques facilitant leur interaction. Ces résultats, issus de la

recherche fondamentale, ont permis de faire avancer nos connaissances sur le rôle de certains canaux ioniques dans les cellules cancéreuses. De telles études sont essentielles pour dans un premier temps comprendre les différentes étapes moléculaires permettant aux cellules cancéreuses d'aboutir à la formation des métastases et dans un second temps cibler une ou plusieurs de ces étapes par des agents thérapeutiques spécifiques. Bien que l'utilisation d'inhibiteurs de NHE1 ou de $Na_V1.5$ en clinique soit délicate compte tenu du caractère ubiquitaire de NHE1 et de l'importance de $Na_V1.5$ dans l'excitabilité cardiaque, une meilleure compréhension de cette voie impliquée dans la dissémination des cellules cancéreuses pourrait conduire à l'établissement de nouveaux marqueurs pronostiques de l'agressivité des tumeurs ou à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques permettant d'inhiber le développement des métastases.

Publication non intégrée à la thèse

GILLET L., ROGER S., POTIER M., BRISSON L., VANDIER C, BESSON P & LE GUENNEC J.-Y. Voltage-gated sodium channels: New targets in cancer therapy? Frontiers in Medicinal Chemistry. 2010

Voltage-Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy?

Ludovic Gillet, Sébastien Roger, Marie Potier, Lucie Brisson, Christophe Vandier, Pierre Besson* and Jean-Yves Le Guennec+

U921 Inserm, Nutrition Croissance Cancer, Université de Tours, Faculté de Médecine, 10 Bd Tonnellé, 37032 TOURS France

Abstract: Early detection and treatment of cancers have increased survival and improved clinical outcome. The development of metastases is often associated with a poor prognostic of survival. Finding early markers of metastasis and developing new therapies against their development is a great challenge. Since a few years, there is more evidence that ion channels are involved in the oncogenic process. Among these, voltage-gated sodium channels expressed in non-nervous or non-muscular organs are often associated with the metastatic behaviour of different cancers. The aim of this review is to describe the current knowledge on the functional expression of voltage-gated sodium channels and their biological roles in different cancers such as prostate, breast, lung (small cells and non-small cells) and leukaemia. As a conclusion, we develop conceptual approaches to understand how such channels can be involved in the metastatic process and conclude that blockers targeted toward these channels are promising new therapeutic solutions against metastatic cancers.

Keywords: Cancers, voltage-gated sodium channels, TTX, metastasis, invasiveness, motility, galvanotaxis.

INTRODUCTION

Cancers are among the leading causes of death in the world and as such represent a major problem of public health. This is the reason why governments, pharmaceutical companies, industrials and academics are all so intensely involved in a better understanding of the etiologies of the diseases. Such efforts aim at the improvement in the early detection of tumours in order to propose more efficient treatments. These could be effective in replacement of or in association with other therapies used presently. One of the new promising fields of investigation is the pharmacology of ion channels which are known to be involved in different aspects of the carcinogenic process. Among ion channels, voltage-gated sodium channels (VGNaC) make the topic of this review. These channels consist of a highly processed α subunit, which is approximately 260 kDa, associated with at least two auxiliary β subunits as displayed in Fig. (**1**) [1]. Sodium channels in the adult central nervous system contain β_2 plus either β_1 or β_3 subunits, while sodium channels in adult skeletal muscle have only

*Corresponding author: Tel: (+33) 2 47 36 60 24; Fax: (+33) 2 47 36 62 26; E-mail: Pierre.Besson@Univ-Tours.Fr

+present address: U637 Inserm, Physiopathologie Cardiovasculaire; Université Montpellier-2; CHU Arnaud de Villeneuve; 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 MONTPELLIER France

Allen B. Reitz / Atta-ur-Rahman / M. Iqbal Choudhary (Eds.)
All rights reserved – © 2010 Bentham Science Publishers.

the β_1 subunit. The pore-forming α subunit is sufficient for functional expression, but the channel and current density, kinetics and voltage-dependence of gating are modified by the β subunits [2]. A new β_2-related subunit called β_4 was recently discovered [3]. A mutation of this protein has been shown to induce a sustained activity of the channel responsible for cardiac arrhythmias (long QT syndrome) [4]. Ten genes encoding VGNaC α subunits have been identified and nine of these have been functionally studied in expression systems and constitute a single family named Na_V1 according to their phylogeny and are designated $Na_V1.1$ to $Na_V1.9$ [5,6]. The remaining isoform, Na_X, shows a structure diverging from the Na_V1 family and seems to be gated by sodium concentration and not by voltage. Based on their tetrodotoxin (TTX) sensitivity, VGNaC are classified as TTX-sensitive or TTX-S ($Na_V1.1$ to $Na_V1.4$, $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$) and TTX-resistant or TTX-R ($Na_V1.5$, $Na_V1.8$ and $Na_V1.9$). VGNaC are classically described as critical elements of action potential initiation and propagation in excitable cells because they are responsible for the initial depolarisation of the membrane. However, these channels are also known to be expressed in non excitable cells such as T-lymphocytes [7].

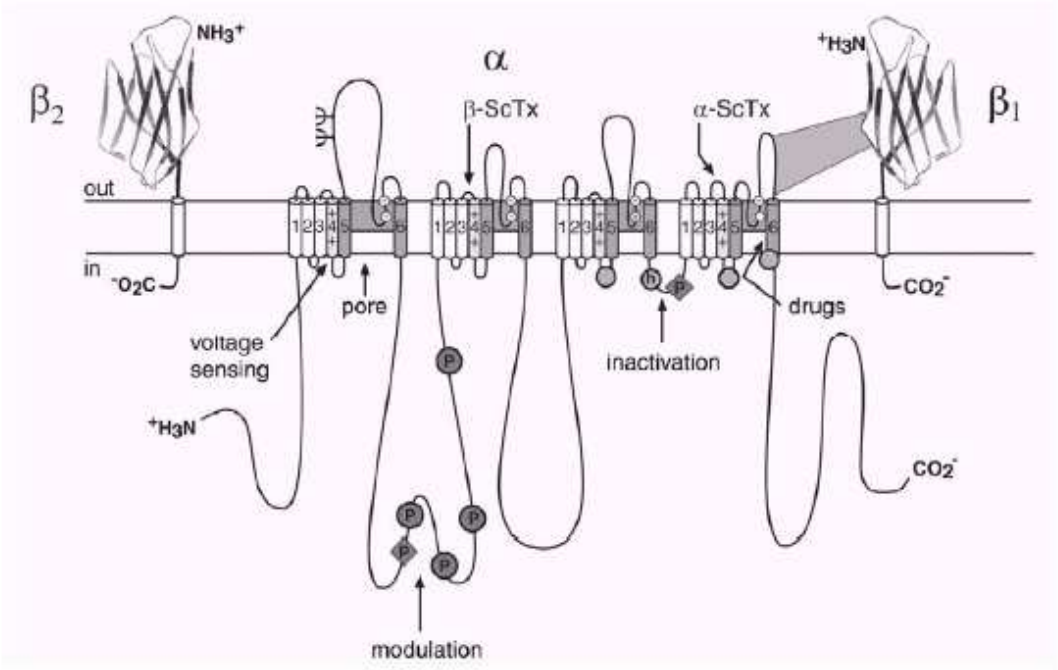


Fig. (1). Subunit structure of the voltage-gated sodium channels. The secondary structures of the α and β subunits of the voltage-gated sodium channels are illustrated as transmembrane folding diagram. Cylinders represent probable alpha helical segments. The different important parts of the channel are indicated (voltage-sensing, pore, modulation, inactivation and interaction with drugs). P indicates sites of demonstrated protein phosphorylation by protein kinase A (circles) and protein kinase C (diamond). Sites of binding of α- and β-scorpion toxins are shown. Reprinted from [1] with permission from Elsevier.

To investigate the expression of proteins like ion channels, techniques such as RT-PCR and immunoblot allow to determine the presence of mRNA and their translation into proteins. However, one state-of-the-art technique exists, namely the patch-clamp technique [8], which allows to quantify the activity of these proteins. Displacement of ions from one com-

partment to another leads to current generation due to the electric charges borne by ions. The patch-clamp technique uses a glass pipette as an electrode to measure the electric current flowing through ion channels. Since the flux of ions depends mainly on passive diffusion, changes in current amplitude directly reflect the changes in channel conformation and thus activity. The two major configurations to measure currents flowing through all the channels of an isolated cell, and thus called whole cell recording, are the "ruptured patch" (the membrane patch at the tip of the pipette is broken and the intracellular content is replaced by the medium present in the pipette) and the "perforated patch" (antibiotics such as amphotericin B present in the pipette medium form pores, into the membrane trapped at the tip of the pipette, to get an electrical access to the interior of the cell while reducing the dilution of intracellular soluble molecules).

To study some aspects of cancers, cultured cell lines are generally used. Different aspects of their biology can refer to different aspect of the disease. For example, cell proliferation *in vitro* can be an index of the kinetics of tumour proliferation *in vivo*. The facilities with which the cells migrate through filters, covered or not with Matrigel® (mimicking the extracellular matrix) are considered as indexes of invasion and migration, respectively. These parameters are both involved in the metastatic properties of the cells. Even if metastatic properties do not depend on cell invasiveness only, extracellular matrix invasion is a prerequisite to get metastases. The evaluation of the capacity of cells to produce metastases can be assessed by injecting the cells into nude mice. Understanding this aspect of the disease is very important because it is the main cause of death by cancer. Metastasis can be summarised as a process whereby cells escaping from a primary tumour enter circulation (blood or lymph), migrate and become lodged at tissue-specific or non-specific sites where they proliferate to form secondary tumours. To escape the primary tumour and to set in a distant site, tumour cells need to produce, or induce host cells to produce, proteases (e.g. matrix metalloproteases, MMP and/or cystein cathepsins) to degrade the extracellular matrix.

PROSTATE CANCER

PCa is the most frequently diagnosed male cancer and the second most common cause of death of men from cancer in Western societies [9]. The first study of a sodium current measured in patch-clamp conditions was made in a rat prostate cancer cell line [10]. In this paper, the authors describe the activity of sodium channels only in a highly metastatic cell line, Mat-Ly-Lu, but not in the weakly metastatic one, AT-2. This current is fully blocked by 1μM TTX suggesting that it is a TTX-S. Proliferation was not affected by TTX. Since the currents were recorded in the metastatic cell line, the authors investigated its possible involvement in the metastatic process using an *in vitro* Matrigel® invasion chamber assay. Incubation of the Mat-Ly-Lu cells with 600 nM TTX for 48 h reduced their invasive capacity by 33%. In contrast, TTX had no significant effect on the invasiveness of the AT-2 cell line. Later on, the same group performed similar experiments in human prostate cancer cell lines, PC-3 and LNCaP, and found similar results [11]. It must be underlined that in both studies [10, 11], the authors reported that not all cells investigated in patch-clamp possess functional sodium channels. This led these authors to further investigate the relationship between protein expression and invasiveness [12]. This study was performed in both rat and human cell lines in which the expression of VGNaC was assessed by flow cytometry using a fluorescein-labelled polyclonal antibody. Weakly metastatic cell lines such as AT-2 and LNCaP displayed almost no expression of VGNaC. On the opposite, highly invasive cell lines such as PC3 and Mat-Ly-Lu displayed bimodal frequency distribution profiles with a subpopulation of cells expressing high levels of sodium channel protein. Comparison of the degree of sodium channels expression with the capacity of the different cell lines to invade

Matrigel® shows a significant positive correlation. In addition, two transfected cell lines, obtained by transfecting genomic DNA from rat prostatic tumour cells into a recipient benign cell line (non invasive), were found to express significantly elevated levels of sodium channel protein compared to the original cell line. This enhanced expression was correlated with increased invasiveness *in vitro*. The only uncorrelated observation in this study is that PNT2 cell line, which is reported to be benign, contains numerous sodium channels. This expression could be subsequent to the transfection with the SV40 genome. It also could mean that cells need more channels than the amount expressed in PNT2 to become invasive [12]. It has also been speculated that the presence of the channels gives the potential for invasion but this is prevented by local factors or the need for other essential criteria such as accumulation of other mutations [12]. Whatever the reason, it must be noticed that, to our knowledge, there was no attempt to determine the functional activity of the channels in PNT2 cells.

Bennet *et al.* (2004) compared a weakly metastatic human cell line, LNCaP, and two increasingly tumorogenic daughter cell lines, C4 and C4-2. They showed that the increasing invasiveness of the C4 and C4-2 cell lines was related with an increasing level of VGNaC proteins measured by immunobloting [13]. TTX at 1 μM completely reversed the difference in invasiveness between C4, C4-2 and LNCaP cell lines. Moreover the transient expression of the skeletal isoform ($Na_V1.4$) of the channel in the 3 cell lines increased their invasive capacity in a TTX-sensitive manner. From their work, it can be concluded that sodium channels expressed are sufficient for prostate cancer cell invasiveness.

TTX Sensitivity of VGNaC

In a very elegant study, the electrophysiological and pharmacological properties of Mat-Ly-Lu cells current have been characterised [14]. The only powerful blocker found was TTX with an IC_{50} of about 18 nM (see Table **1**). Such sensitivity makes this channel a TTX-S.

Isoform(s) of the Channel(s)

The question of the isoforms expressed was addressed both in Mat-Ly-Lu (rat) and PC3 (human) cell lines. These cells express mRNA coding for the skeletal isoform SkM1 now named $Na_V1.4$ [15]. *In situ* hybridation experiments indicated that the levels of mRNA expression were very variable from cell to cell in Mat-Ly-Lu cells. In contrast, this signal was more uniform in AT-2 cells although at much lower levels. In the same vein, LNCaP cells also expressed $Na_V1.4$ transcript. In that study, they did not find any mRNA expression for $Na_V1.1$ (also called RB I), $Na_V1.2$ (RB II), $Na_V1.3$ (RB III), Nax (NaG/SCL-11) and $Na_V1.6$ (Na6) in any of the cell lines tested. It was concluded that all cell lines expressed VGNaC mRNA although the channel was functional only in highly metastatic cell lines [15]. However, the authors noticed that the pharmacological properties of the functional protein were particular since 10 μM μ-conotoxin was needed to completely block the current while nanomolar concentrations are usually enough to block the skeletal sodium current (see also [14]). This surprising result led the authors to re-investigate this point using other molecular biology methods (degenerate primer screening and semi-quantitative PCR) on the same cell lines [16]. They found that the main mRNA isoform expressed in Mat-Ly-Lu and PC3 cells was $Na_V1.7$ and this was thus likely to be the main source of the functional VGNaC detected. Other isoforms are observed such as $Na_V1.1$, $Na_V1.2$, $Na_V1.4$ (see Table **1** and Fig. **2A**). Recently, Nakajima *et al.* (2009) showed that silencing genes coding $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$ inhibited endocytosis and invasiveness in PC-3 cells [17].

Table 1. List of the Non-Central Nervous System Cancers in which VGNaC have been Studied

Cancer Type	Cell Lines	mRNA Expression	TTX Sensitivity	Functional Expression	VGNaC Role	VGNaC in Biopsies	References
Prostate	PC-3	$Na_V1.7$ $Na_V1.2$ $Na_V1.3$	8.6 nM	$fNa_V1.7$	Invasion Motility (G) Motility (WH)	Yes (IH)	[11, 16, 34]
	LnCaP	$Na_V1.2$		No current			[11, 16]
	Mat-Ly-Lu (rat)	$Na_V1.7$ $Na_V1.1$ $Na_V1.4$	18 nM	$fNa_V1.7$	Invasion Motility (G) Motility (WH)	?	[10, 14, 16]
	AT-2 (rat)	$Na_V1.1$ $Na_V1.4$ $Na_V1.9$		No current	---	---	[10, 16]
Normal (immortalised)	PNT-2	?		No current	---	---	[31]
Breast	MDA-MB-231	$Na_V1.7$ $Na_V1.5$ $Na_V1.6$	≈2 µM	$fNa_V1.5$	Invasion	Yes (RT-PCR)	[44, 50, 55]
	MCF-7	$Na_V1.5$ $Na_V1.6$ $Na_V1.7$		No current	---	---	[44]
	MDA-MB-468	?		No current			[44]
Normal (long term primoculture)	HMEC	$Na_V1.6$ $Na_V1.7$ $Na_V1.2$	?	Tiny current	Unknown (non invasive cells)		Personal data (not shown)
Cervix	JP, 354, 085 (primary cultures)	$Na_V1.2$ $Na_V1.7$ $Na_V1.4$ $Na_V1.6$	5-15 nM	Current	?	Yes (RT-PCR)	[73]
Melanoma	C8161, C8146	?	6 nM	Current	?	?	[72]
Malignant Pleural Mesenthelioma	Primary MPM cells	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.2$	16 nM	Current	Motility	Yes	[74]
Small-Cell Lung Cancer	H146 H128 H69	? ? ?	215 nM ? ?	Current Current Current	? ? Endocytosis	? ? ?	[64, 65] [64] [64,66]

Table 1. contd....

Cancer Type	Cell Lines	mRNA Expression	TTX Sensitivity	Functional Expression	VGNaC Role	VGNaC in Biopsies	References
Non-Small-Cell Lung Cancer	H460	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.5$ $Na_V1.3$	=10 nM	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$	Invasion	Yes (RT-PCR)	[67]
	Calu-1	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.5$ $Na_V1.1$ $Na_V1.2$ $Na_V1.3$ $Na_V1.9$ $Na_V1.8$	=5 nM + =1 µM	$Na_V1.5$ $Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.1$ $Na_V1.2$ $Na_V1.3$	Invasion		[67]
	H23	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.5$	=10 nM	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$	Invasion		[67]
Normal (immortalised)	A549	$Na_V1.6$ $Na_V1.7$		No current	---	---	[67]
Normal (immortalised)	NL20	$Na_V1.7$ $Na_V1.6$ $Na_V1.2$ $Na_V1.3$		No current	---	---	[67]
	BEAS-2B	$Na_V1.5$ $Na_V1.7$ $Na_V1.1$ $Na_V1.6$		No current	---	---	[67]
Leukaemia	K562	?	?	Current	?	?	[68]
	K562			No current	---	---	[69]
	K562/ADM	?	<100 nM	Current	?	?	[69]
	CCRF-CEM	?	<150 nM	Current	?	?	[70]
	CEM/VLB_{100}	?	<150 nM	Current	?	?	[70]
	Jurkat	$Na_V1.5$ $Na_V1.7$ $Na_V1.9$	= 900 nM	$Na_V1.5$	Invasion		[71]

Cell lines indicates the human cancer cell lines used (except when "rat" is indicated in brackets); ***mRNA expression*** indicates the mRNA coding for the channels sorted in order of decreasing intensity as determined by semi-quantitative RT-PCR; ***TTX sensitivity*** indicates the constant of inhibition of the current by TTX; ***functional expression*** indicates the isoform of the channel which likely bears the current measured in patch-clamp. If a current was recorded but the isoform not determined then it is indicated "Current"; ***VGNaC role*** indicates the role of the channel *in vitro* as determined after inhibition by TTX. G indicates motility assessed by galvanotaxis; WH indicates motility assessed by wound-healing assay; ***VGNaC in biopsies*** indicates the presence or not of the mRNA (RT-PCR) or protein (immuno-histochemistry, IH) in biopsies obtained from patients. "?": not determined or unknown.

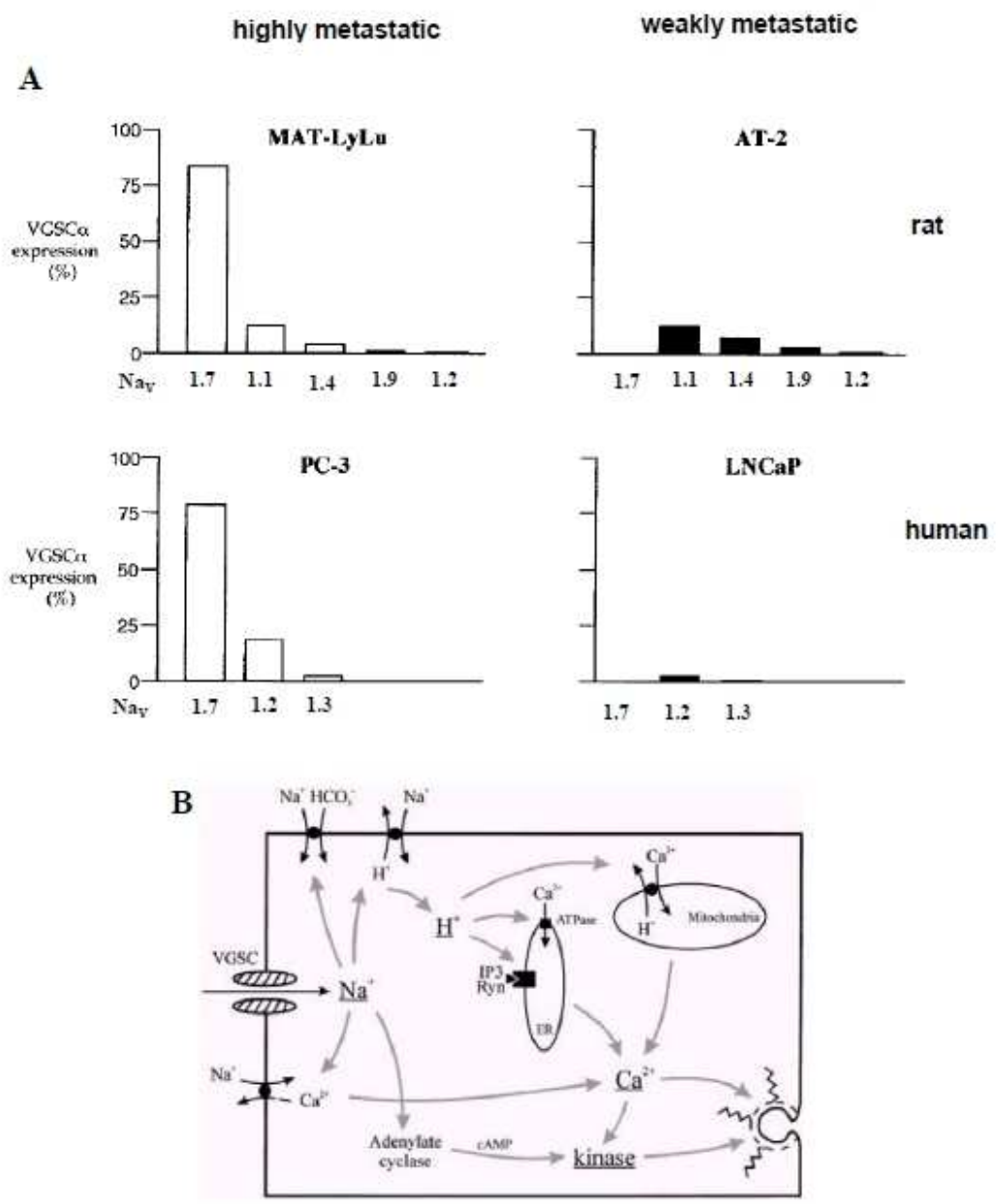


Fig. (2). VGNaC in prostatic cancer cells. **A**, expression levels of the various VGNaC α subunits indicated below the bars. In each case, the vertical axis denotes the approximate level of expression with respect to mRNA levels in the highly metastatic counterpart. **B**, Schematic diagram of the possible mechanisms modulating membrane vesicle recycling involving Na^+ influx resulting from VGNaC (VGSC) activity. The scheme illustrates possible down-stream and microdomain effects of rising intracellular Na^+. Intracellular sodium can affect intracellular calcium and pH. Both modulations of homeostasis could in turn modify the activity of kinases involved in exocytoses. Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; IP_3/Ryn, inositol triphosphate and/or ryanodine receptor. The "kinase" may be protein kinase A, C or CaM kinase II. A from [16] and B from [28]. Reprinted with permission of Wiley-Liss Inc, a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

Interestingly, $Na_V1.4$ has been transiently expressed in LNCaP, C4 and C4-2 cells lines [13]. In each cell line, transient expression of the protein induced a large increase in invasiveness which was completely reversed by 1 µM TTX. This result confirms the role played by sodium channel in the invasion process. Above all, this result indicates that, even if $Na_V1.7$ seems to be the channel primarily involved in invasive properties of rat and human prostate cancer cell lines, other isoforms of the channel can render cells invasive.

Biological Consequences of Sodium Channels Activity

To address this important question, the group of Mustafa Djamgoz (Imperial College, London, UK) tested three different cellular processes important to PCa metastasis: galvanotaxis, motility and invasion.

I - Galvanotaxis is the ability of cells to respond to an electric field by moving directionally. Such a property is known to be involved in a number of basic biological process such as embryonic development [18] but also in other physiological conditions such as wound healing [19]. To evaluate this property, Mat-Ly-Lu and AT-2 cells were exposed to exogenous direct-current electric fields of physiological strength [20, 21]. In these conditions, it has been shown that highly metastatic Mat-Ly-Lu cells responded to the application of an electric field by migrating towards the cathode. AT-2 cells gave no such response. The migration of Mat-Ly-Lu cells was blocked by 1 µM TTX while 10 µM veratridine, a sodium channel opener, enhanced it. This study thus showed that galvanotaxis of metastatic cells is under the control of the VGNaC activity. The precise mechanisms involved in this particular case are not understood but some hypotheses have been put forward based on other cases (see [22]).

II - Motility is an integral component of the metastatic cascade and involves sub-cellular mechanisms like changes in cell volume, cell-matrix interaction, cytoskeletal elements and ion channels activity. In 1999, Fraser *et al.* [23] found that VGNaC activity played a significant role in determining the morphological development of Mat-Ly-Lu cells. Later on, the same group completed this observation by showing that lateral motility of these cells, assessed using a "wound-heal" assay, was significantly reduced with 1 µM TTX [24]. Quite surprisingly, 20 µM veratridine did not affect motility of these cells while aconitine (100 µM) and ATXII (25 pM), two other "sodium-openers", increased it. At this concentration, veratridine did not affect cell proliferation while at 50 µM, proliferation was reduced [25]. The lack of veratridine effect could be due to its interaction with other ion channels [24].

III – Before cells migrate into the local circulation and then interact with other particular tissues to form a secondary tumour, the extracellular matrix has to be digested. This is done by proteases such as matrix metalloproteases (MMPs) (see [26] for review) and/or cystein cathepsins [27]. *In vitro*, this property, called invasiveness, is evaluated through the potency of cells to migrate through filters coated with a film of Matrigel®. An indirect way to evaluate the capacity of cells to release proteases by exocytosis is to measure the secretory membrane activity. This was done by Mycielska *et al.* who measured the uptake of horseradish peroxidase (HRP) [28]. Since the recycling of membrane constituents requires close matching between the levels of endocytosis and exocytosis, HRP uptake is a marker of secretory membrane activity. Mat-Ly-Lu cells have a higher activity than AT-2 cells [28]. This difference is abolished in presence of 1 µM TTX while veratridine did not increase the activity in Mat-Ly-Lu cells. To explain this surprising result, it has been proposed that the VGNaC would be working at maximal efficiency [28]. From these results, different hypotheses were

proposed to link the VGNaC activity to the increased membrane trafficking as illustrated on Fig. (**2B**). One hypothesis was that Na^+ influx could disrupt intracellular pH which would lead to a release of Ca^{2+} from intracellular stores. This Ca^{2+} could then activate protein kinase C and/or CaM kinase II and lead to phosphorylation of the actin cytoskeleton thereby allowing secretion and endocytosis to occur. An alternative hypothesis is that a direct action of Na^+ on adenylate cyclase could alter levels of cAMP which activates protein kinase A. The changes in actin cytoskeleton phosphorylation would similarly allow secretion and endocytosis.

Since veratridine affects VGNaC dependent parameters such as galvanotaxis without affecting others like motility and membrane secretory activity, it appears that the relationship between the channels activity and the final effects is rather complex as is the dependence of membrane secretory activity when analysed by fractal methods [29]. This might mean that motility and secretory activities are already maximal and thus cannot be enhanced by an increase in VGNaC activity.

One of the major functions of normal prostate gland is the synthesis, accumulation and secretion of large amounts of citrate [30]. During the progression of malignancy, the intermediate metabolism of citrate is altered. This can have important implications on cellular bioenergetics, cell growth and apoptosis, angiogenesis [30]. The mechanism of citrate release by human normal prostatic cells, PNT2-C2, has been studied [31]. They found that these cells functionally express an electrogenic citrate transporter which mediates the cotransfert of 1 citrate (trivalent anion) alongside 4 K^+ out of the cells. A similar study was also performed in a highly metastatic cell line, PC-3M [32]. The K^+/citrate cotransporter found in PNT2-C2 cells was also found in PC-3M cells. However, PC-3M cells also expressed a novel Na^+-dependent citrate transporter. Interestingly, the expression of this transporter was controlled by the VGNaC activity: treatment of the cells with 1 µM TTX induced a reduction of the activity of the Na^+-dependent transporter while the K^+-dependent transporter activity increased. The contribution of the citrate transporters to metastatic disease has to be understood to determine their interplay with VGNaC activity.

The diagram shown on Fig. (**2B**), underlines a very important unresolved question: how does sodium enter the cells through the channel? Usually, VGNaC are opened following a depolarisation leading to the triggering of an action potential. In the case of cancer cells, it has been proposed that metastatic prostate cancer cells membrane are "potentially electrically excitable" since they express both sodium and potassium voltage-gated channels [33]. However, such action potentials have never been observed, spontaneously or triggered, weakening such a hypothesis. An explanation might arise in view of some electrophysiological properties of the channel (see the Breast cancer section).

Regulation of Prostate Cancer VGNaC

Cancer cells are very sensitive to the chemical conditions of the *in vivo* environments encountered during tumorigenesis and metastatic spread (see in [33]). Among them Nerve Growth Factor (NGF) and Epidermal Growth Factor (EGF) have been associated with prostate cancer progression and have also been found to up-regulate VGNaC expression (see [33]). Such factors can be found in the serum used to grow cells in culture. Using Mat-Ly-Lu cells, it was shown that, depending on the serum concentration used to grow cells, the electrophysiological properties of the current varied, suggesting both transcriptional and post-transcriptional regulations of the channel. Interestingly, the sensitivity of the current to TTX also varied [33]. This has been interpreted by the authors as a possible regulation of the expression of the different mRNA isoforms. This finding is of importance since weakly

metastatic cells often express VGNaC transcripts (see Table **1**). It is thus possible that changes in the surrounding environment, such as an increase in growth factors, can amplify the functional expression of VGNaC rendering the cells more invasive.

Expression of VGNaC in Patients

Up-regulations of VGNaC in PCa have been shown in two studies. In the first one, an antibody directed against an intracellular epitope of VGNaC was used on tissue microarray slides of 80 clinical PCa specimens and 4 normal prostate specimens [34]. Out of 80 PCa specimens, 44 showed higher levels of VGNaC compared to normal, with 14 (of 44) showing increased focal staining in scattered individual cells or small group of cells. It thus appears that the observations obtained in prostate cancer cell lines are pertinent with those made in PCa tumour specimens: in prostate cancer, an increased level of expression of the VGNaC is observed. Recently, another study went further by showing that the level of expression of the mRNA coding for $Na_V1.7$ is related with the grade of PCa: the higher the grade, the higher the expression of $Na_V1.7$ mRNA [35]. Thus, the expression of $Na_V1.7$ has been proposed to be a potential novel marker for human prostate cancer [35].

These results led some research groups to develop new molecules targeted against VGNaC in order to block their activity (see [36] for review). This underlines the interest these channels might have as new therapeutic targets. The problems with these studies are that: (i) the VGNaC isoform tested ($Na_V1.2$) has not been shown to be involved in cell invasion [37] and (ii) the cellular function evaluated (proliferation) is not affected by the functional VGNaC expression [36, 37].

BREAST CANCER

Among women, breast cancer is the most common cancer and the first cause of death. Death occurs primarily after the development of metastasis. Until the beginning of the XXIst century, the studies on ion channels and breast cancer focused mainly on potassium channels and their involvement in proliferation [38-42]. Also, the role of the Ca^{2+} -activated chloride channel, coded by the CLCA2 gene, was also studied with regard to tumour metastasis [43]. It was found that it was a tumour repressor. All these studies showed that ion channels can be involved in breast cancer genesis.

In the beginning of the 2000's, two different research groups, our group in Tours and the one of Mustafa Djamgoz in London, showed at the same time that VGNaCs were expressed in a highly metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231 [44, 45]. As shown on Fig. (**3A**), the electrophysiological features of the current are not particular except for the voltage activating threshold (voltage at which the channel starts opening) which is more positive than in the case of the cardiac current. This is proposed to be related to the foetal *vs* adult isoform (see below), but could also be due to a particular arrangement with auxiliary β subunits. Indeed, it is known that co-expression of β_1 with the $Na_V1.5$ pore-forming subunit in HEK293 cells induces a positive shift of the activation and inactivation voltage relations curves, associated with a slowing of the reactivation kinetic [46]. Interestingly, this subunit has shown to be functionally expressed in MDA-MB-231 cells [47].

The current recorded in MDA-MB-231 cells was not observed in two other cell lines, MCF-7 and MDA-MB-468. MCF-7 cells are weakly invasive *in vitro* and non-metastatic in nude mice. MDA-MB-468 cells have an invasive capacity similar to that of MDA-MB-231 cells [44] but are less metastatic [48]. Like in PCa, it seems that VGNaC participates to invasion *in vivo* leading to higher metastatic potentials.

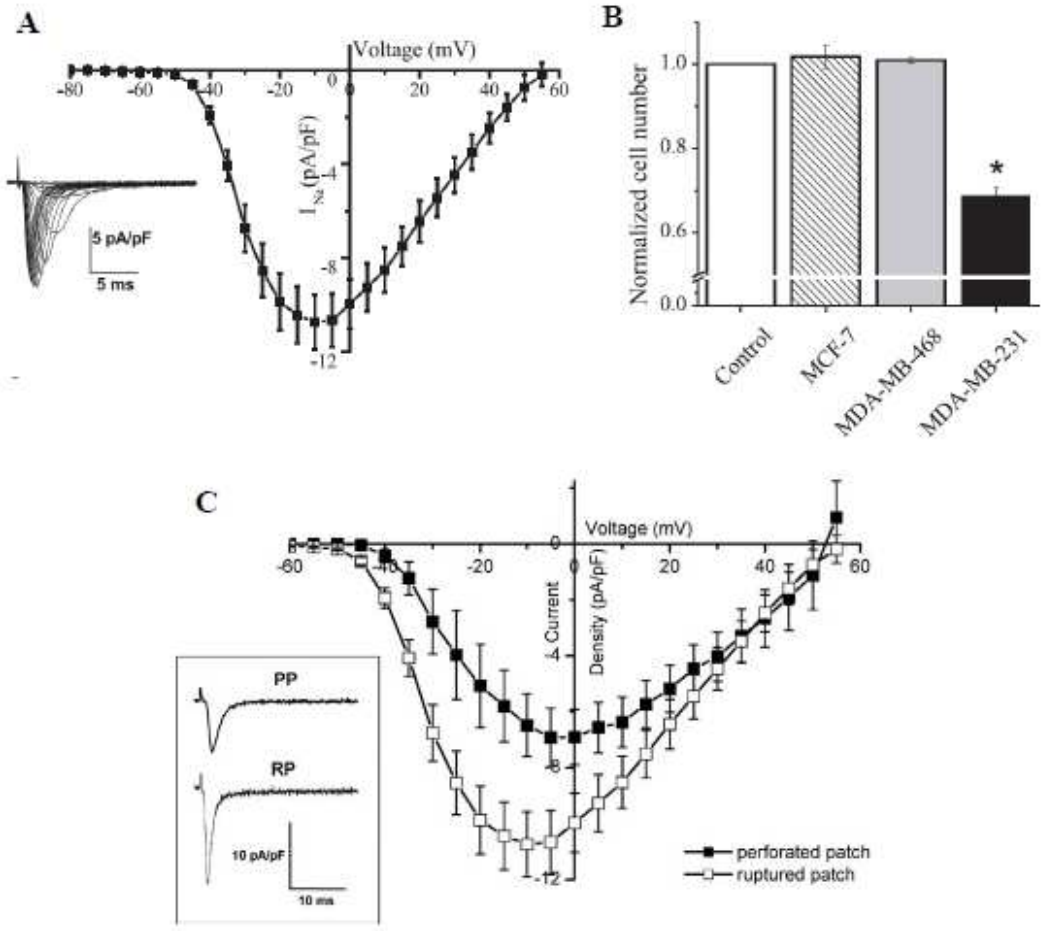


Fig. (3). VGNaC in breast cancer cells. **A**, sodium current-voltage relationship of MDA-MB-231 cells. The inset on the left shows a family of currents recorded from a cell depolarised, from a holding potential of –100 mV, from –50 to +20 mV by 5 mV increments. **B**, relative effects of 30μM TTX on Matrigel® invasion of three different breast cancer cell lines as compared to control. **C**, influence of the patch-clamp configuration on sodium current-voltage relationship. The inset shows an example of currents recorded from cells depolarised at –10 mV from a holding potential of –100 mV in perforated patch (PP) and ruptured patch (RP). A and B from [44] reprinted with permission from Elsevier; C from [55] with kind permission of Springer Science and Business Media.

Pharmacological and Electrophysiogical Profile of VGNaC

The pharmacology of the sodium channel expressed in MDA-MB-231 cells is rather particular [44, 49]. While its TTX sensitivity is consistent with a TTX-R isoform of the channel (see Table **1**), the channel is surprisingly also sensitive to some calcium channel blockers with IC_{50} of 53.2 ± 3.6 μM for diltiazem and 37.6 ± 2.5 μM for verapamil, which are concentrations classically used to block calcium channels [49]. The VGNaC mainly expressed in these cells is the foetal isoform of $Na_V1.5$, coming from alternative splicing [50]. This could explain the particular pharmacology of the channel towards calcium channels blockers, while the TTX sensitivity is the same than the adult isoform [49,51]. This finding

could also bring another explanation why verapamil was beneficially used along with conventional chemotherapy [52]. In that study, verapamil was used as a chemoresistance inhibitor. We propose that it could also have worked as a VGNaC blocker.

Electrophysiological properties for this neonatal isoform have recently been compared to those of the adult $Na_V1.5$, and several changes such as a more positive activation threshold and slower activation / inactivation kinetics were associated to this neonatal splicing. This is mainly linked to the substitution of one aa; the aspartate in position 211 into a lysine residue [51].

Isoform(s) of the Channel(s)

Semi-quantitative RT-PCR showed that $Na_V1.5$, $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$ mRNA are expressed in MDA-MB-231 cells [50, 53]. The low TTX sensitivity of the channel ($IC_{50} \approx 2$ µM [44]) strongly suggests that the main isoform functionally expressed is $Na_V1.5$. However, a minor expression of a functional TTX-S isoform has been also suggested [50].

Biological Consequences of Sodium Channels Activity ?

To evaluate the role of this channel, the specific blocker of the VGNaC, TTX was initially used. Since the $Na_V1.5$ is a TTX-R channel, 30 µM of TTX was used to block all the channels [44]. This elevated concentration of TTX has never been shown to affect other proteins activity, or more generally, other biological activity than VGNaC. Neither cell proliferation nor migration was affected by the blockade of VGNaC. On the other hand, *in vitro* invasion was reduced by about 30% in MDA-MB-231 cells and it was not changed in MCF-7 and MDA-MB-468 cells, which do not express such functional channels (Fig. **3B**). Similar results were obtained in a more recent study using 10 µM TTX [50] and by specifically down regulating $Na_V1.5$ expression using RNA interference [54, 55]. Conversely, invasion was increased by the "sodium-opener" veratridine [55] reinforcing the potential role of VGNaC in invasion. It thus seems that the activity of the channels participates in the degradation of the Matrigel®.

Other properties involved in the metastatic process such as galvanotaxis, exocytosis and lateral motility have been shown to be under the control of the VGNaC activity [50]. Regarding cell migration through filters with calibrated pores, results are discrepant. In one study, no effect of 30 µM TTX on transwell migration through 8 µM diameter pores was reported [44]. Moreover, we performed wound-healing assays with MDA-MB-231 cells and found no effect of TTX (unpublished data). In contrast, the group of Djamgoz found that transwell migration through 12 µM diameter pores was inhibited partially by 10 µM TTX [50]. Since a similar reduction was observed in an *in vitro* invasion assay, the results obtained by Fraser *et al.* [50] suggest that the main effects of VGNaC activity are exerted through modifications of cell motility while in the case of Roger *et al.* [44], the only effect is through the modulation of the capacity of cells to degrade Matrigel®. This apparent discrepancy has currently no obvious explanation.

In agreement with our cell invasion observations, we recently demonstrated that $Na_V1.5$ activity controls cathepsin B and S through a regulation of perimembrane pH [55]. Such a mechanism, which also applies to the human lung cancer cell line H460 [55] and the prostatic cancer cell line PC3 (unpublished data), can explain the reduced invasion observed.

We also showed that while $Na_V1.5$ is not involved in the regulation of breast cancer cell proliferation *per se,* it regulates the growth of cancer cell colonies [55]. Thus we can postulate that VGNaC could also be involved in primary tumour growth.

Regulation of Breast Cancer VGNaC

The sodium channel expressed in MDA-MB-231 cells can be regulated but the precise mechanisms are still unknown. The configuration of the patch-clamp used to study the channel was reported to affect some electrophysiological characteristics of the sodium current (Fig. **3C**) [57]. The ascending limb of the I-V curve (from -60 to -10 mV) was shifted leftward in ruptured patch compared to perforated patch conditions and this was associated with slower kinetics of recovery of the channel from inactivation. Interfering effects on signalling pathways with the patch-clamp configuration have been observed in cardiac cells and have been attributed to intracellular content dilution [58]. The observations made in the breast cancer cell line were thus interpreted as a consequence of the dilution of a factor involved in a signalling pathway such as the PKC pathway, induced by the intracellular perfusion in ruptured patch-clamp. Other dedicated experiments have to be performed to evaluate how the expression of the channel is regulated by environmental factors such as growth factors. At the transcriptional level, it has been recently shown that the PKA signalling pathway could increase the expression of the neonatal underscript $Na_V1.5$ [47].

Expression of VGNaC in Patients

The relationship between the expression of the channel mRNA with lymph node invasion has been studied [50]. It was found that patients with lymph node invasion, determined using anatomo-pathological techniques, expressed mRNA for $Na_V1.5$ while those who were negative for lymph node invasion did not express mRNA for this VGNaC. This correlation was not observed for $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$. The immunohistochemical staining of human breast tissues for the $Na_V1.5$ indicates no staining in normal tissues while a strong heterogeneous staining was observed in cancerous tissues [50]. These findings suggest that the expression of neonatal $Na_V1.5$ can be used as a prognostic factor of metastatic development. The development of a neonatal specific antibody directed against the neonatal isoform of $Na_V1.5$ has been undertaken [56].

These results strongly suggest that the observation made in a highly metastatic cancer cell line, MDA-MB-231 are not restricted to a cell line but can be transposed to the evolution of the disease. The particular isoform of the channel expressed, associated with its unusual pharmacology suggests that a particular treatment targeted toward this channel, without side effects on cardiac function, can be developed.

The unanswered question is still: how are VGNaC involved in the invasive phenotype of these cells ? We proposed that, since it has never been possible to record an action potential, the membrane potential of MDA-MB-231 cells would have to be in a particular range of the sodium channel activity. Indeed, at that potential (-29 ± 2 mV, n = 65 cells), the sodium channel is partially activated and not fully inactivated [44]. The resulting ionic current is called a window current. What is important is that, even without any action potential, the partial opening of the channel leads to a continuous entry of sodium into the cell. This entry might be responsible for the increased intracellular sodium concentration observed in biopsies [59] which in turn can modulate other homeostases such as calcium or proton. After those changes, the consequences on cell physiology can be the same as the one presented on Fig. (**2B**), which concerns prostate cancer cells.

LUNG CANCERS

Lung cancer is the most common cancer over the world, with more than one million cases of death a year. It is divided in two major histopathological groups: non-small cell lung cancer and small cell lung cancer which occur with frequencies of 80% and 20% re-

spectively [60]. Small cell lung cancer affects mainly non smokers and is characterised by rapidly proliferating tumours and poor prognosis. This cancer is often associated with a neuromuscular autoimmune disease characterised by the insufficient release of acetylcholine from the motor nerve terminal [61] and known as the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Non-small cell lung cancer is the very widespread kind of lung cancer which is associated with smoking. The occurrence of metastases, initially appearing in lymph nodes and then in other organs such as lung itself, brain, bone, bone marrow, liver, adrenal glands, is always a marker of poor prognosis.

Small Cells

Small-cell lung cancer cells have been shown to be neuroendocrine-like cells capable of producing action potentials [62]. This discovery has been reinforced by others who suggested that small-cell lung cancer cells derived from primitive endodermal cells which differentiate into neuroendocrine cells [63]. Later, the ionic channels expressed in different cell lines (H128, H69 and H146) were characterised and VGNaC were found to be expressed in all of them [64]. These VGNaC and a calcium current also present were able to elicit action potentials [65]. Both channels were blocked by autoimmune antibodies responsible for the Lambert-Eaton syndrome.

The sodium channels expressed in H146 cells were weakly sensitive to TTX (Ki = 215 nM) (see Fig. **4A**) [65]. From their analysis of electrophysiological and pharmacological characteristics, they determined that only one population of TTX-resistant sodium channels was expressed. Since these cells are neuroendocrine-like and since they are able to produce action potentials, it is tempting to assume that they are involved in excitation-secretion coupling function. However, as noticed by Blandino *et al*. [65], the resting membrane potential of the H146 cells was approximately -44 mV, a level sufficient to inactivate most of the Na^+ channels (see Fig. **4B**). Either the resting membrane potential of this kind of cells is actually more hyperpolarised in tumours than it was measured in H146 or these sodium channels are not involved in the elicitation of action potentials [65]. In that latter case, we propose an alternative hypothesis described in the conclusion section.

In a recent study, it has been observed that in H69 and other small-cell lung cancer cell lines (H209 and H510), 100 nM TTX reduced Horse Radish Peroxidase uptake suggesting a role for VGNaC in the exocytic activity [66]. However, the presence of functional VGNaC has not been undertaken in H209 and H510 cells and other properties involved in the metastatic phenotype have not been evaluated.

Non Small Cells

4 cancer cell lines (H23, H460, A549, Calu-1) and 2 non-cancerous epithelial cell lines (NL-20, BEAS-2B) were tested [67]. While the non-cancerous cells did not have functional channels as measured in patch-clamp conditions, three cancer cell lines (H23, H460 and Calu-1) expressed functional channels with different electrophysiological and pharmacological properties (see Table **1**) [67].

TTX Sensitivity of VGNaC

The most striking difference between the cell lines concerns the isoforms expressed functionally, as determined by their TTX sensitivity. This sensitivity was in the nanomolar range in H23 and H460 cells. Thus the protein isoforms belonged to TTX-S in these cell lines. For Calu-1 cells, there were clearly two kinds of channels expressed: TTX-R and

TTX-S. In contrast with the other cancers described in this paper, the heterogeneous sensitivity to TTX indicates heterogeneity in isoforms expression between cell lines.

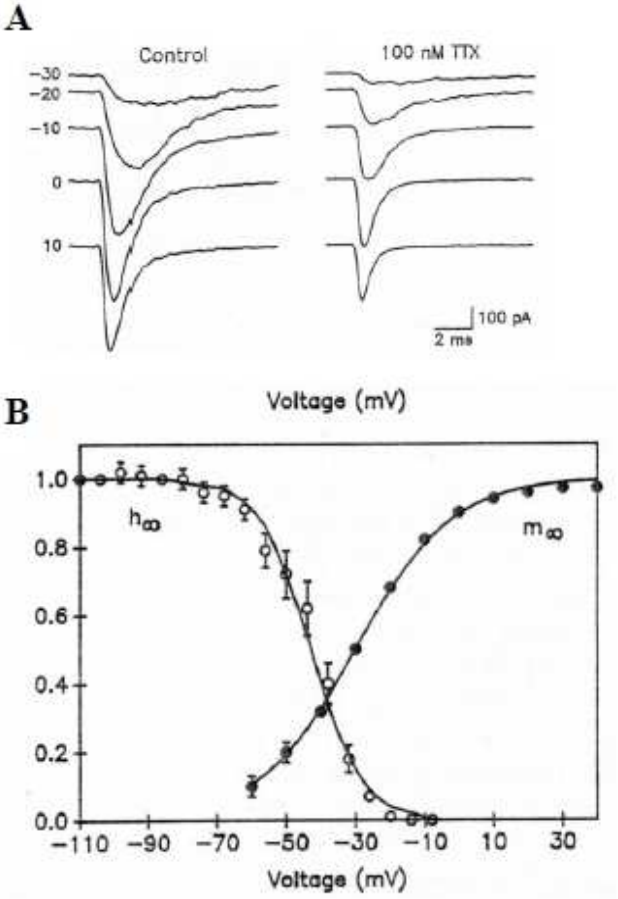


Fig. (4). VGNaC in small cell lung cancer cells. Voltage dependent sodium currents recorded from H146 cells. A, whole-cell currents were evoked from depolarizing test potentials of 40 ms duration varying from –30 to +10 mV with 10 mV increments. The holding potential was –80 mV. Left, current observed in control conditions and the right panel illustrates current traces obtained in presence of 100 nM TTX. B, Pseudo-steady-state activation (m_∞) and inactivation (h_∞) parameters of I_{Na}. From [65] with kind permission of Springer Science and Business Media .

Isoforms of the Channels

Semi-quantitative RT-PCR experiments indicated that all the studied cell lines (cancerous and non-cancerous) expressed mRNA for the $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$ isoforms which are both TTX-S. In the case of H23 and H460 cells, $Na_V1.7$ transcripts were more abundant and were possibly responsible for the expressed functional channels. However, a possible expression of $Na_V1.6$ cannot be rejected. These cells express mRNA for the $Na_V1.5$ isoform but the TTX sensitivity of the current suggests that it was not functionally expressed. Calu-1 cells expressed transcripts for all the isoforms except for $Na_V1.4$. The most abundant mRNA was, in descending order, those of $Na_V1.7$, $Na_V1.6$, $Na_V1.5$, $Na_V1.1$ and $Na_V1.3$. The particular pharmacology of the current, which is clearly both TTX-R and TTX-S, indicates that

the $Na_V1.5$ is functionally expressed. With regard to TTX-S, the situation is more complicated since mRNA for $Na_V1.6$, $Na_V1.7$ and $Na_V1.1$ are comparably expressed and a possible participation of $Na_V1.3$ cannot be rejected.

Knowing that non-cancerous cells, NL-20 and BEAS-2B, express mRNA for $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$, plus $Na_V1.5$ for the latter, like the cancerous cell lines, but did not have functional proteins, it is tempting to speculate that these cells have the potential to functionally express these VGNaC but they miss something to do it.

Biological Control of Sodium Channels Activity

The effect of μM TTX on proliferation, migration and Matrigel® invasion was tested on the 6 different cell lines [67]. We followed the same protocols that we previously used on breast cancer cell lines [44]. In all cell lines, TTX had no effect on proliferation and migration. An effect was only observed when TTX was applied and Matrigel® invasion evaluated. In that case, a reduction of invasion between 40 to 50% was observed in H23, H460 and Calu-1 cells which functionally express the VGNaC. Calu-1 cells express functional TTX-S and TTX-R VGNaC. Application of different concentrations of TTX blocking TTX-S or TTX-S + TTX-R VGNaC led to a gradual reduction of *in vitro* invasion. This indicates that both isoforms of channels are involved in the invasion properties of the cells.

Expression of VGNaC in Patients

In an unpublished study, we performed semi-quantitative RT-PCRs on 10 cancerous and associated non-cancerous lung biopsies collected from the same patients. The mRNA coding for the 9 isoforms of Na_V were tested. In contrast to what could be expected from the cell line experiments, we did not observe an up-regulation of Na_V mRNA expression. Rather, there is a tendency for a down-regulation. These results indicate that mRNA expression was modified during the disease. Nothing is known about their translation in proteins and VGNaC activity. This is of importance since we found that only VGNaC activity is important in the invasion process. Cross-talks have been described between the functioning of VGNaC and mRNA production. For example, the application of 1 μM TTX to rat prostatic cancerous cells Mat-Ly-Lu increased the production of mRNA coding for the VGNaC [32]. Thus, we can hypothesise that a reduction in mRNA can result in a decreased channel activity but also that it is a consequence of an increased channel activity. Additional experiments at the functional level, using patch-clamp, are needed to elucidate this question.

LEUKAEMIA

There are few studies about the role of VGNaC in leukaemia. The first one was a brief description showing that the leukaemia cancer cell line K562 expressed a VGNaC [68]. During the same period of time, another research group, using the same cell line, did not find this current except in particular conditions in which cells became resistant to anticancerous drugs (MDR phenotype) [69]. This current was blocked by nM TTX ($Ki<100$ nM). While the functional expression of the sodium current was clearly associated with the MDR phenotype, it was not involved in the resistance to chemotherapy since 1 μM TTX had no effect on vincristine (an anticancerous drug) uptake.

Following this work, leukaemia cell lines from T-cell origin were studied: CCRF-CEM and a MDR variant CEM/VLB_{100} [70]. Contrarily to the work of Yamashita *et al.* [69], they found that a sodium current was observed in both cell lines and as such was not associated with the MDR phenotype. Here again, the current was sensitive to TTX ($Ki < 150$ nM).

In conclusions of these three studies, there is no clear link between VGNaC activity and the MDR phenotype. Moreover, the role of VGNaC, if there is one, is not described in these studies. Interestingly, a recent study showed that 8-9% of Jurkat cells, a cell line derived from leukemic T-lymphocytes, expressed a sodium current [71]. This study confirmed the presence of a sodium current on T-lymphocytes and T-lymphocytes-derived cell lines [7]. This current is blocked by TTX with a Ki around 900 nM and as such can be classified as TTX-resistant. RT-PCR analysis indicates the presence of mRNA for at least 4 isoforms of VGNaC, two of them being TTX-R, $Na_V1.5$ and $Na_V1.9$. $Na_V1.8$ was not detected and for the authors, the protein which is most likely expressed is $Na_V1.5$. The mRNA coding for $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$ were also observed but to a lesser extent. Interestingly, Matrigel® invasion assays on Jurkat cells were performed [71]. In control conditions, about 8% of the cells were invasive, close to the percentage of cells expressing an electrophysiologically detectable sodium current. Following treatment with 10 μM TTX, invasiveness was decreased by approximately 93% (see Fig. **5**). This suggests that the observation of a sodium current in leukaemia cells might not be due to a neo-synthesis of VGNaC but to an up-regulation of already expressed channels (see conclusions for development).

GENERAL CONCLUSIONS

As shown on Table **1**, functional expression of VGNaC (mainly $Na_V1.7$, $Na_V1.6$ and $Na_V1.5$) is often associated with invasive properties of some cancer cell lines, and while their function is still unknown, sodium currents have also been characterized in melanoma [72] and in primary cultures of human cancers such as cervix cancer and pleural mesenthelioma [73, 74]. VGNaC are also expressed in biopsies from metastatic patients. VGNaC are classically described as being responsible of the excitability and propagation of the action potential. This is why the presence of VGNaC is often interpreted as an indication of possible excitability whatever the tissue in which it is found. However, in cancer cells, the membrane potential is less negative than it is in excitable cells. This strongly suggests that the channels must be partially inactivated. The membrane potential of cancer cells is often, if not always, located in a window of voltage where there is a continuous entry of sodium owing to a partial activation and incomplete inactivation of VGNaC (see Fig. **4**). This led us to hypothesise that such an entry of sodium could be responsible for an increase in intracellular calcium which can then enhance the release of proteases [44], in accordance with results obtained on prostatic cancer cells [28]. However, we recently showed that the cystein cathepsin expression (at the RNA and protein levels) and secretion are not altered by Na_V activity [55]. Another hypothesis is a regulation of the intracellular pH (pHi) and perimembrane pH (pHp) by Na_V activity. Intracellular sodium regulates pHi mainly through the activity of the sodium-proton exchangers (NHE) and the sodium-bicarbonate exchangers. Indeed, it is known that many proteins involved in the metastatic process are tightly regulated by the surrounding pH [28]. In the case of PCa, VGNaC activity regulates a specific sodium-dependent citrate transport [32]. However, this is one aspect of the physiology which is particular to the prostate functioning. The regulation of invasion by VGNaC activity strongly suggests that there is a regulation of proteases or growth factors release and/or activity which is common to all the cancers described. Recently, the role of the acidic proteases cysteine cathepsins, mainly B and S, has been highlighted [55].

Beside its effect on motility and invasion, the sodium channels can have other roles which are important in the process of metastatic tumour development. Indeed it is often reported that among highly invasive cell lines (as determined *in vitro*), those which express the VGNaC are more metastatic when injected in nude mice than are those which lack the

VGNaC. This feature might be brought by the adherence properties of auxiliary β-subunits such as the β_2 [75] and β_1 [47]. Indeed, these subunits can help migrating cells to settle in specific metastatic site (e.g. lung, bones) and then invade this tissue to develop the secondary tumour.

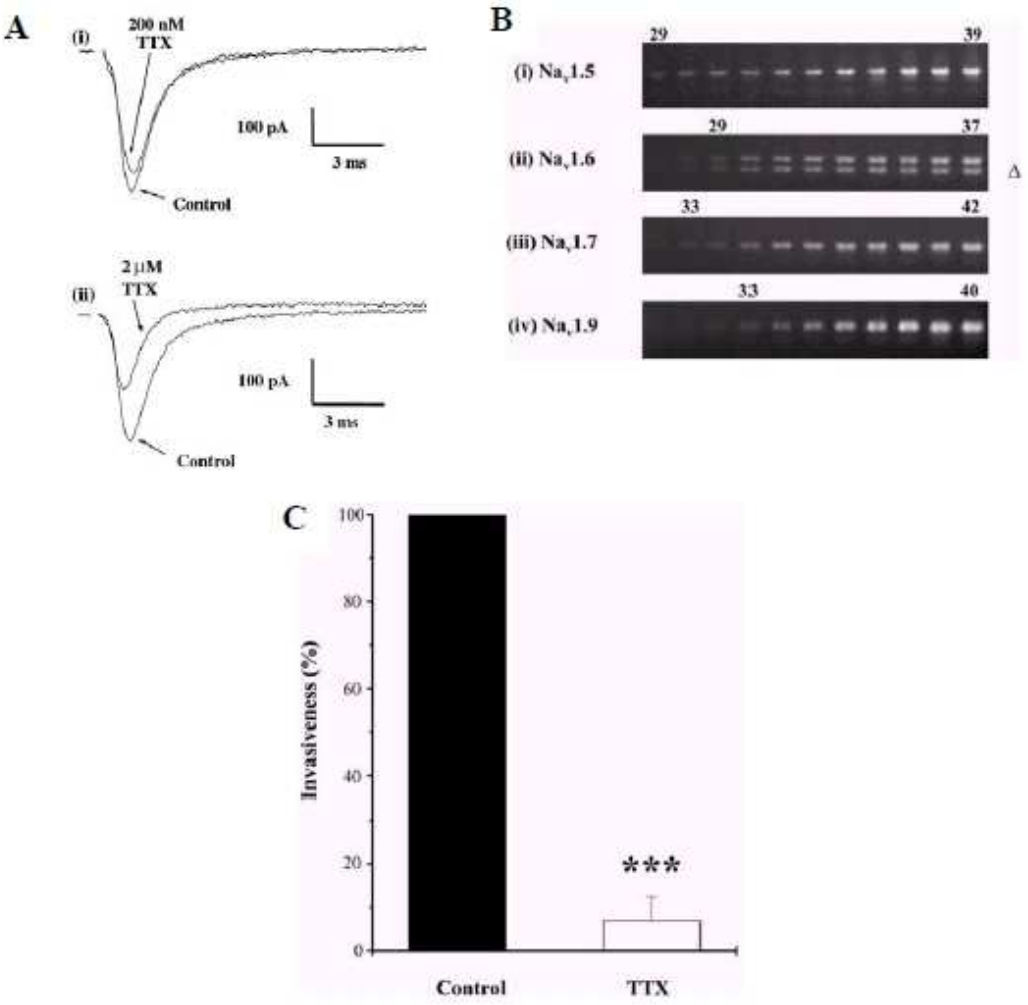


Fig. (5). VGNaC in leukemic cells (Jurkat cells). **A**, From a holding potential of –100 mV, a 30 msec test pulse to –10 mV every 10 sec elicits a rapid inward current which is not very sensitive to 200 nM (i) and 2 μM (ii) TTX. **B**, Semi-quantitative PCR gel images for (i) $Na_V1.5$, (ii) $Na_V1.6$, (iii) $Na_V1.7$ and (iv) $Na_V1.9$ products amplified from Jurkat cells. PCR cycle numbers for given bands are indicated above the gels. Δ denotes the mis-transcribed/exon-skipped form of $Na_V1.6$. **C**, Matrigel® invasiveness by Jurkat cells under control conditions (dark bar) and following treatment with 10 μM TTX (light bar). The asterisks (***) indicate that the difference was statistically significant ($p<0.001$). From [70] with the permission of the authors.

A question arises considering that VGNaC can be expressed in different cancer cells and in very few "normal" cells. Does this expression represent dedifferentiation towards a more embryonic phenotype? It has been proposed that embryonic genes, which are silent in the

cells of the mature organ, are re-expressed in cancer cells [76]. In line with this hypothesis, the splice variant of VGNaC expressed in prostate and breast cancers are neonatal (see [77]). This hypothesis is also reinforced by the observation that cultured normal cells (smooth muscle cells, retinal pigment epithelial cells) express VGNaC while freshly isolated cells do not [78-82]. From the literature regarding the role of VGNaC in cancer cells, it seems that its main role is to participate in the invasive capacity of the cells. We can thus assume that VGNaC are expressed in cells during particular events of embryogenesis. For example, during the embryonic development, cells need to migrate and invade to find the nest where the organ can develop. The invasion before nesting can be due to the production of proteases which are, at least partially, under the control of a VGNaC. After the nesting of the cells, the no longer necessary genes encoding the VGNaC can be switched off. Mutations during carcinogenesis might lead to the switch on of the silent genes. It is known that some regions of the chromosomes are more sensitive to mutations like deletions. For example, it has been reported that in renal, breast and lung carcinomas, there are frequent deletions in chromosome 3p21.3 [83, 84]. The 3p21 region contains numerous genes including $Na_V1.5$ and $Na_V1.9$ (see [5]). It is thus possible that the probability to have mutations leading to the oncogenic process is higher in chromosome regions corresponding to genes active during the fœtal period. If this hypothesis is true, it could explain the fœtal-splice form expressed in some cancer cells and the overall specificity of the isoform expressed in some cancers (for example $Na_V1.5$ in breast cancer and $Na_V1.7$ in prostate cancers).

In conclusion, VGNaC are found in several metastatic cancers and their functional expression may represent a more generic involvement in physiological and pathophysiological invasive processes. These ionic channels probably interfere with calcium homeostasis which in turn modifies signalling pathways involved in invasiveness, a prerequisite to metastasis formation. As such, these channels, as fœtal isoforms, represent a promising new field of investigations to develop new specific blockers to fight some metastatic cancers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The results on the expression of VGNaC in cancerous lung tissues were obtained thanks to collaboration with Yves Gruel and Jerôme Rollin (U618 Inserm, University of Tours). We are indebted to Philippe Bougnoux for sharing with us his knowledge in oncology and to Yves Gruel, Jérôme Rollin, Jacques Goré, Karine Mahéo, Marie-Lise Jourdan, Sophie Vibet and Aurélia Barascu for helpful discussions on cellular physiology of cancerous cells. The work on VGNaC is supported by "La Ligue contre le Cancer Région Centre" and the Canceropole Grand-Ouest.

ABBREVIATIONS

VGNaC	=	Voltage-gated sodium channel
TTX	=	Tetrodotoxin
TTX-S	=	Tetrodotoxin-sensitive channel
TTX-R	=	Tetrodotoxin-resistant channel
PCa	=	Prostate cancer
MMP	=	Matrix metalloproteases
I-V	=	Current-voltage

REFERENCES

[1] Catterall, W. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **2000**, *26*, 13-25.

[2] Isom, L. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, **2001**, *7*, 42-54.

[3] Yu, F.; Westenbroek, R.; Silos-Santiago, I.; McCormick, K.; Lawson, D.; Ge, P.; Ferriera H.; Lilly, J.; DiStefano, P.; Catterall, W.; Scheur, T.; Curtis, T. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J. Neurosci.*, **2003**, *23*(20), 7577-8755.

[4] Medeiros-Domingo, A.; Kaku, T.; Tester, D.; Iturralde-Torres, P.; Itty, A.; Valdivia, C.; Ueda, K.; Canisales-Quinteros, S.; Tusié-Luna, M.; Makielski, J.; Ackerman, M. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, **2007**, *116*, 134-1342.

[5] Goldin, A.; Barchi, R.; Caldwell, J.; Hofmann, F.; Howe, J.; Hunter, J.; Kallen, R.; Mandel, G.; Meisler, M.; Netter, Y.; Noda, M.; Tamkun, M.; Waxman, S.; Wood, J.; Catterall, W. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **2000**, *28*, 365-368.

[6] Goldin, A. Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.*, **2001**, *63*, 871-894.

[7] DeCoursey, T.; Chandy, K.; Gupta, S.; Cahalan, M. Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes. *J. Neuroimmunol.*, **1985**, *10*(1), 71-95.

[8] Hamill, O.; Marty, A.; Neher, E.; Sackman, B.; Sigworth, F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **1981**, *391*(2), 85-100.

[9] Parker, S.; Tong, T.; Bolden, S.; Wingo, P. Cancer statistics. *C.A. Cancer J. Clin.*, **1996**, *46*, 5-27.

[10] Grimes, J.; Fraser, S.; Stephens, G.; Downing, J.; Laniado, M.; Foster, C.; Abel, P.; Djamgoz, M. Differential expression of voltage-activated Na^+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness *in vitro*. *FEBS Letters*, **1995**, *369*, 290-294.

[11] Lanadio, M.; Lalani, E.; Fraser, S.; Grimes, J.; Bhangal, G.; Djamgoz, M., Abel, P. Expression and functional analysis of voltage-activated Na^+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion *in vitro*. *Am. J. Pathol.*, **1997**, *150*(4), 1213-1221.

[12] Smith, P.; Rhodes, N.; Shortland, A.; Fraser, S.; Djamgoz, M.; Ke, Y.; Foster, C. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Lett.*, **1998**, *423*,19-24.

[13] Bennett, E.; Smith, B.; Harper, J. Voltage-gated Na^+ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflügers Arch.*, **2004**, *447*, 908-914.

[14] Grimes, J.; Djamgoz, M. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na^+ current expressed in the highly metastatic Mat-Ly-Lu cell line of rat prostate cancer. *J. Cell Physiol.*, **1998**, *175*, 50-58.

[15] Diss, J.; Stewart, S.; Fraser, S.; Black, J.; Dib-Hajj, S.; Waxman, S.; Archer, S.; Djamgoz, M. Expression of skeletal muscle-type voltage-gated Na^+ channel in rat and human prostate cancer cell lines. *FEBS Lett.*, **1998**, *427*, 5-10.

[16] Diss, J.; Archer, S.; Hirano, J.; Fraser, S.; Djamgoz, M. Expression profile of voltage-gated Na^+ channels α-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate*, **2001**, *48*, 165-178.

[17] Nakajima, T.; Kubota, N.; Tsutsumi, T.; Oguri, A.; Imuta, H.; Jo, T.; Oonuma, H.; Soma, M.; Meguro, K.; Takano, H.; Nagase, T.; Nagata, T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br. J. Pharmacol.*, **156**, 420-431.

[18] Jaffe, L.; Nuccitelli, R. Electrical controls of development. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1977**, *6*, 445-476.

[19] Chiang, M.; Robinson, K.; Vanable, J. Electrical fields in the vicinity of epithelial wounds in the isolated bovine eye. *Exp. Eye Res.*, **1992**, *54*, 999-1003.

[20] Djamgoz, M.; Mycielska, M.; Madeja, Z.; Fraser, S.; Korohoda, W. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na^+ channel activity. *J. Cell. Sci.*, **2001**, *114*, 2697-2705.

[21] Szatkowski, M.; Mycielska, M.; Knowles, R.; Kho, A.; Djamgoz, M. Electrophysiological recordings from the rat prostate gland *in vitro*: identified single-cell and transepithelial (lumen) potentials. *B.J.I. International*, **2000**, *86*, 1068-1075.

[22] Mycielska, M.; Djamgoz, M. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J. Cell. Sci.*, **2004**, *117*, 1631-1639.

[23] Fraser, S.; Ding, Y.; Liu, A.; Foster, C.; Djamgoz, M. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic Mat-Ly-Lu rat prostate cancer cell line. *Cell. Tissue Res.*, **1999**, *295*, 505-512.

[24] Fraser, S.; Salvador, V.; Manning, E.; Mizal, J.; Altun, S.; Raza, M.; Berridge, R.; Djamgoz, M. Contribution of functional voltage-gated Na^+ channel expression to cell behaviours involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J. Cell. Physiol.*, **2003**, *195*, 479-487.

[25] Fraser, S.; Grimes, J.; Djamgoz, M. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate*, **2000**, *44*, 61-76.

[26] Egeblad, M.; Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 161-174.
[27] Mohamed, M.; Sloane, B. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 764-775.
[28] Mycielska, M.; Fraser, S.; Szatkowski, M.; Djamgoz, M. Contribution of functional voltage-gated Na^+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II: secretory membrane activity. *J. Cell. Physiol.*, **2003**, *195*, 461-469.
[29] Krasowska, M.; Grzywna, Z.; Mycielska, M.; Djamgoz, M. Patterning of endocytic vesicles and its control by voltage-gated Na^+ channels activity in rat prostate cancer cells: fractal analyses. *Eur. Biophys. J.*, **2004**, *33*, 353-342.
[30] Costello, L.; Franklin, R. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. *Oncology*, **2000**, *59*, 269-282.
[31] Mycielska, M.; Djamgoz, M. Citrate transport in the human prostate epithelial PNT2-C2 cell line: electrophysiological analyses. *J. Physiol.*, **2004**, *559*(3), 821-833.
[32] Mycielska, M.; Palmer, C.; Brackenbury, W.; Djamgoz, M. Expression of Na^+-dependent citrate transport in strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage-gated Na^+ channels activity. *J. Physiol.*, **2005**, *563*(2), 393-408.
[33] Ding, Y.; Djamgoz, M. Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na^+ current in the Mat-Ly-Lu cell line of rat prostate cancer. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2004**, *36*, 1249-1260.
[34] Abdul, M.; Hoosein, N. Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity. *Anticancer Res.*, **2002**, *22*(3), 1727-1730.
[35] Diss, J.; Stewart, D.; Pani, F.; Foster, C.; Walker, M.; Patel, A.; Djamgoz, M. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression *in vivo*. *Prostate cancer Prostatic Dis.*, **2005**, *8*, 266-273.
[36] Sikes, R.; Walls, A.; Brennen, W.; Anderson, J.; Choudhury, I.; Schenk, H.; Brown, M. Therapeutic approaches targeting prostate cancer progression using novel voltage-gated ion channel blockers. *Clin. Prostate Cancer*, **2003**, *2*(3), 181-187.
[37] Anderson, J.; Hansen, T.; Lenkowski, P.; Walls, A.; Choudhury, I.; Schenck, H.; Friehling, M., Höll, G.; Patel, M.; Sikes, R.; Brown, M. Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, *2*, 1149-1154.
[38] Wonderlin, W.; Woodfork, K.; Strobl, J. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumour cells through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, **1995**, *165*, 177-185.
[39] Ouadid-Ahidouch, H.; Chaussade, F.; Roudbaraki, M.; Slomianny, C.; Dewailly, P.; Delcourt, P.; Prevarskaia, N. Kv1.1 K^+ channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *278*, 272-277.
[40] Ouadid-Ahidouch, H.; Le Bourhis, X.; Roudbaraki, M.; Toillon, R.; Delcourt, P.; Prevarskaya, N. Changes in the K^+ current density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether a gogo K^+ channel. *Recept. Channels*, **2001**, *7*, 345-356.
[41] Mu, D.; Chen, L.; Zhang, X.; See, L.; Koch, C.; Yen, C.; Tong, J.; Spiegel, L.; Nguyen, K.; Servoss, A.; Peng, Y.; Pei, L.; Marks, J.; Lowe, S.; Hoey, T.; Jan, L.; McCombie, W.; Wigler, M.; Powers, S. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*, **2003**, *3*(3), 297-302.
[42] Roger, S.; Potier, M.; Vandier, C.; Le Guennec, J-Y.; Besson, P. Description and role in proliferation of IbTx sensitive-currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biophys. Biochim. Acta*, **2004**, *1667*(2), 190-199.
[43] Gruber, A., Pauli, B. Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca^{2+}-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res.*, **1999**, *59*(21), 5488-5491.
[44] Roger, S.; Besson, P.; Le Guennec, J-Y. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1616*, 107-111.
[45] Fraser, S.; Salvador, V.; Manning, E.; Mizal, J.; Altun, S.; Reza, M.; Djamgoz, M. Voltage-gated sodium channel expression in human breast cancer cells: possible functional role in metastasis. *Breast Cancer Res. Trends*, **2002**, *76*, S142.
[46] Xiao, Y.; Wright, S.; Wang, G.; Morgan, J.; Leaf, A. Coexpression with β1-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1 αNa^+ channels. *Am. J. Physiol.*, **2000**, *279*(1), H35-46.
[47] Chioni, A.; Brackenbury, W., Calhoun, J.; Isom, L.; Djamgoz, M.A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated sodium channels beta 1 subunit. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2009**, *41*, 1216-1227.
[48] Zhang, R.; Fidler, I.; Price, J. Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis*, **1991**, *11*(4), 204-215.

[49] Roger, S.; Le Guennec, J-Y.; 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*, 610-615.

[50] Fraser, S.; Diss, J.; Chioni, A-M.; Mycielska, M.; Pan, H.; Yamaci, R.; Pani, F.; Siwy, Z.; Krakowska, M.; Grzywna, Z.; Brakenburry, W.; Theodorou, D.; Koyutürk, M.; Kaya, H.; Battaloglu, E.; Tamburo De Bella, M.; Slade, M.; Tolhurst, R.; Palmieri, C.; Jiang, J.; Latchman, D.; Coombes R.; Djamgoz, M. Voltage-gated sodium channels expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*(15), 5381-5389.

[51] Onkal, R.; Mattis, J.; Fraser, S.; Diss, J.; Shao, D.; Okuse, K.; Djamgoz, M. Alternative splicing of $Na_V1.5$: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J. Cell Physiol.*, **2008**, *216*, 716-726.

[52] Belpomme, D.; Gauthier, S.; Pujade-Lauraine, E.; Facchini, T.; Goudier, M.; Krakowski, I.; Netter-Pichon, G.; Frenay, M.; Gousset, C.; Marié, F.; Benmiloud, M.; Sturtz, F. Verapamil increases the survival of patients with anthracyclin-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann. Oncol.*, **2000**, *11*, 1471-1476.

[53] Judé, S.; Roger, S.; Martel, E.; Besson, P.; Richard, S.; Bougnoux, P.; Champéroux, P.; Le Guennec, J-Y. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2006**, *90*, 299-325.

[54] Brackenbury, W.; Chioni, A.; Diss, J.; Djamgoz, M. The neonatal splice variant of $Na_V1.5$ potentiates *in vitro* invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2007**, *101*, 149-160.

[55] Gillet, L.; Roger, S.; Besson, P.; Lecaille, F.; Goré, J.; Bougnoux, P.; Lalmanach, G.; Le Guennec, J-Y. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsine-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 8680-8691.

[56] Chioni, A-M.; Fraser, S.; Pani, F.; Foran, P.; Wilkin, G.; Diss, J.; Djamgoz, M. A novel polyclonal antibody specific for the $Na_V1.5$ voltage-gated Na^+ channel "neonatal" splice form. *J. Neurosci., Methods*, **2005**, *147*, 88-98.

[57] Roger, S.; Besson, P.; Le Guennec, J-Y. Influence of the whole-cell patch-clamp configuration on electrophysiological properties of the voltage-dependent sodium current expressed in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Eur. Biophys. J.*, **2004**, *33*, 274-279.

[58] Liu, S.; Kennedy, R. α1-adrenergique activation of L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am. J. Physiol.*, **1998**, *274*, 2203-2207.

[59] Cameron, I.; Smith, N.; Pool, T.; Sparks, R. Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis *in vivo*. *Cancer Res.*, **1980**, *40*, 1493-1500.

[60] Travis, W.; Colby, T.; Corrin, B.; Shimasoto, Y.; Brambilla, E. World Health Organization. Histological Typing of Lung and Pleural Tumors. In International Histological Classification of Tumors. 3rd ed. Berlin, Springer Verlag, **1999**.

[61] Elmqvist, D.; Lambert, E. Detailed analysis of neuromuscular transmission in a patient with the myasthenic syndrome sometimes associated with bronchogenic carcinoma. *Mayo Clin. Proc.*, **1968**, *43*, 689-713.

[62] Tischler, A.; Dichter, M.; Biales, B. Electrical excitability of oat cell carcinoma. *J. Pathol.*, **1977**, *122*, 153-156.

[63] Pietra, G. The pathology of carcinoma of the lung. Semin. *Roentgen*, **1990**, *25*, 25-33.

[64] Pancrazio, J.; Viglione, M.; Tabbara, I.; Kim, Y. Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells. *Cancer Res.*; **1989**, *49*, 5901-5906.

[65] Blandino, J.; Viglione, M.; Bradley, W.; Oie, H.; Kim, Y. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. *J. Membr. Biol.*, **1995**, *143*, 153-163.

[66] Onganer, P.; Djamgoz, M. 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.

[67] Roger, S.; Rollin, J.; Barascu, A.; Besson, P.; Raynal, P-I.; Iochmann, S.; Lei, M.; Bougnoux, P.; Gruel, Y.; Le Guennec, J-Y. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small cell lung cancer lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *39*, 774-786.

[68] Schlichter, L.; Sidell, N.; Hagiwara, S. Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 451-455.

[69] Yamashita, N.; Hamada, H.; Tsuruo, T.; Ogata, E. Enhancement of voltage-gated Na^+ channel current associated with multidrug resistance in human leukemia cells. *Cancer Res.*; **1987**, *47*: 3736-3741.

[70] Lee, S.; Deutsch, C.; Beck, W. Comparison of ion channels in multidrug-resistant and –sensitive human leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 2019-2023.

[71] Fraser, S.; Diss, J.; Lloyd, L.; Pani, F.; Chioni, A-M.; George, A.; Djamgoz, M. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na^+ channel activity. *FEBS Lett.*, **2004**, *569*, 191-194.

[72] Allen, D.; Lepple-Wienhues, A.; Cahalan, M. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J. Membr Biol.*, **1997**, *155*, 27-34.FIG

[73] Diaz, D.; Delgadillo, D.; Hernandes-Gallegos, E.; Ramirez-Dominguez, M.; Hinojosa, L.; Ortiz, C.; Berumen, J.; Carnacho, J.; Gomora, J. Functionnal expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *J. Cell. Physiol.*, **2007**, *210*, 469-478.

[74] Fulgenzi, G.; Graciotti, L.; Faronato, M.; Soldoviery, M.; Miceli, F.; Amoroso, S.; Annunziato, L.; Procopio, A.; Taglialatela, M. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2006**, *38*, 1146-1159.

[75] Kim, D-O.; Ingano, L.; Carey, B.; Pettingell, W.; Kovacs, D. Presenilin/γ-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channels β_2 subunit regulates cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*(33), 23251-23261.

[76] Monk, M.; Holding, C. Human embryogenic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene*, **2001**, *20*, 8085-8091.

[77] Diss, J.; Fraser, S.; Djamgoz, M. Voltage-gated Na^+ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *Eur. Biophys. J.*, **2004**, *33*, 180-193.

[78] Wen, R.; Lui, G-M.; Steinberg, R. Expression of a tetrodotoxin-sensitive Na^+ current in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J. Physiol.*, **1994**, *476*.2, 187-196.

[79] Choby, C.; Mangoni, M.; Boccara, G.; Nargeot, J.; Richard, S. Evidence for tetrodotoxin-sensitive sodium currents in primary cultured myocytes from human, pig and rabbit arteries. *Pflügers Arch.*, **2000**, *440*,149-152.

[80] Walsh, K.; Wolf, M.; Fan, J. Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **1998**, *274*, 506-512.

[81] Gordienko, D.; Tsukahara, H. Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na^+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar artery and human umbilical vein. *Pflügers Arch.*, **1994**, *428*, 91-93.

[82] Vargas, F.; Caviedes, P.; Grant, S. Electrophysiological characterisation of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.*, **1994**, *47*, 153-165.

[83] Braga, E.; Senchenko, V.; Bazov, I.; Loginov, W.; Liu, J.; Ermilova, V.; Kazubskaya, T.; Garkavtseva, R.; Mazurenko, N.; Kisseljov, F.; Lerman, M.; Klein, G.; Kisselev, L.; Zabarovsky, E. Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3p on major human epithelial malignacies: allelotyping and quantitative real-time PCR. *Int. J. Cancer*, **2002**, *100*, 534-541.

[84] Senchenko, V.; Liu, J.; Loginov, W.; Bazov, I.; Angeloni, D.; Seryogin, Y.; Ermilova, V.; Kazubskaya, T.; Garkavtseva, R.; Zabarovska, V.; Kashuba, V.; Kisselev, L.; Minna, J.; Lerman, M.; Klein, G.; Braga, E.; Zabarovsky, E. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene*, **2004**, *23*, 5719-5728.

Bibliographie

Ouvrage imprimé

JOFFRE, Michel. *Electrophysiologie moléculaire, T1 La technique patch clamp*. Hermann, 2001, 178 p.

Ouvrages électroniques

INSTITUT NATIONAL DU CANCER. *La situation du cancer en France en 2011*. [en ligne], Boulogne-Billancourt : INCa, 2011, [référence du 12 mai 2012]. http://lesdonnees.e-cancer.fr/

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, NEYMAN N, AMINOU R, ALTEKRUSE SF, KOSARY CL, RUHL J, TATALOVICH Z, CHO H, MARIOTTO A, EISNER MP, LEWIS DR, CHEN HS, FEUER EJ, CRONIN KA. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations).* [en ligne], National Cancer Institute. Bethesda, MD. Publié en avril 2012, [référence du 12 mai 2012]. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/

Travaux universitaires

DRIFFORT, Virginie. *Développement de lignées cancéreuses mammaires modifiées au niveau de l'expression des sous-unités du complexe $Na_V1.5$et évaluation des propriétés électrophysiologiques et oncogéniques associées*. Mémoire de Master II recherche, Université de Tours, juin 2010, 30p.

GILLET, Ludovic. *Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires et régulation par l'acide docosahexaènoïque*. Thèse de doctorat, Université de Tours, 3 septembre 2010, 290p.

Sites web consultés

Institut Jules Bordet. [référence du 9 mai 2012], http://www.bordet.be/fr/presentation/historic/cancer/cancer.htm

Globocan 2008. [référence du 12 mai 2012], http://globocan.iarc.fr/

Organisation mondiale de la santé. [référence du 13 mai 2012], http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html

Servier Medical Art. [référence du 24 mai 2011], http://www.servier.fr/server-medical-art

IUPHAR database. [référence du 30 mai 2012],

http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=IC

Publications internationales

Abriel, H. (2010) Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 2-11.

Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S. and Tsien, R. Y. (1991) Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**: 694-697.

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**: 834-846.

Aharonovitz, O., Zaun, H. C., Balla, T., York, J. D., Orlowski, J. and Grinstein, S. (2000) Intracellular pH regulation by Na(+)/H(+) exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**: 213-224.

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. *Circ Res* **96**: 991-998.

Ahlskog, J. K., Dumelin, C. E., Trussel, S., Marlind, J. and Neri, D. (2009) In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 4851-4856.

Ahmed, S., Thomas, G., Ghoussaini, M., Healey, C. S., Humphreys, M. K., Platte, R., Morrison, J., Maranian, M., Pooley, K. A., Luben, R., Eccles, D., Evans, D. G., Fletcher, O., Johnson, N., dos Santos Silva, I., Peto, J., Stratton, M. R., Rahman, N., Jacobs, K., Prentice, R., Anderson, G. L., Rajkovic, A., Curb, J. D., Ziegler, R. G., Berg, C. D., Buys, S. S., McCarty, C. A., Feigelson, H. S., Calle, E. E., Thun, M. J., Diver, W. R., Bojesen, S., Nordestgaard, B. G., Flyger, H., Dork, T., Schurmann, P., Hillemanns, P., Karstens, J. H., Bogdanova, N. V., Antonenkova, N. N., Zalutsky, I. V., Bermisheva, M., Fedorova, S., Khusnutdinova, E., Kang, D., Yoo, K. Y., Noh, D. Y., Ahn, S. H., Devilee, P., van Asperen, C. J., Tollenaar, R. A., Seynaeve, C., Garcia-Closas, M., Lissowska, J., Brinton, L., Peplonska, B., Nevanlinna, H., Heikkinen, T., Aittomaki, K., Blomqvist, C., Hopper, J. L., Southey, M. C., Smith, L., Spurdle, A. B., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Hien, R. R., Cornelissen, S., Milne, R. L., Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Schmutzler, R. K., Burwinkel, B., Bartram, C. R., Meindl, A., Brauch, H., Justenhoven, C., Hamann, U., Chang-Claude, J., Hein, R., Wang-Gohrke, S., Lindblom, A., Margolin, S., Mannermaa, A., Kosma, V. M., Kataja, V., Olson, J. E., Wang, X., Fredericksen, Z., Giles, G. G., Severi, G., Baglietto, L., English, D. R., Hankinson, S. E., Cox, D. G., Kraft, P., Vatten, L. J., Hveem, K., Kumle, M., Sigurdson, A., Doody, M., Bhatti, P., Alexander, B. H., Hooning, M. J., van den Ouweland, A. M., Oldenburg, R. A., Schutte, M., Hall, P., Czene, K., Liu, J., Li, Y., Cox, A., Elliott, G., Brock, I., Reed, M. W., Shen, C. Y., Yu, J. C., Hsu, G. C., Chen, S. T., Anton-Culver, H., Ziogas, A., Andrulis, I. L., Knight, J. A., Beesley, J., Goode, E. L., Couch, F., Chenevix-Trench, G., Hoover, R. N., Ponder, B. A., Hunter, D. J., Pharoah, P. D., Dunning, A. M., Chanock, S. J. and Easton, D. F. (2009) Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* **41**: 585-590.

Akram, S., Teong, H. F., Fliegel, L., Pervaiz, S. and Clement, M. V. (2006) Reactive oxygen species-mediated regulation of the Na+-H+ exchanger 1 gene expression connects intracellular redox status with cells' sensitivity to death triggers. *Cell Death Differ* **13**: 628-641.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988.

Albrechtsen, R., Stautz, D., Sanjay, A., Kveiborg, M. and Wewer, U. M. (2011) Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. *Exp Cell Res* **317**: 195-209.

Alexander, N. R., Branch, K. M., Parekh, A., Clark, E. S., Iwueke, I. C., Guelcher, S. A. and Weaver, A. M. (2008) Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol* **18**: 1295-1299.

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. *J Biol Chem* **281**: 29002-29010.

Allen, D. G. and Xiao, X. H. (2003) Role of the cardiac Na+/H+ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **57**: 934-941.

Allen, D. H., Lepple-Wienhues, A. and Cahalan, M. D. (1997) Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol* **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. *Circ Res* **98**: 1538-1546.

Almog, N. (2010) Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* **294**: 139-146.

Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C. T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S. M. and De Simone, G. (2009) Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16233-16238.

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+ Channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Biol Chem* **286**: 16846-16860.

Anger, T., Madge, D. J., Mulla, M. and Riddall, D. (2001) Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *J Med Chem* **44**: 115-137.

Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S. and Becchetti, A. (2009) Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr Med Chem* **16**: 66-93.

Arcangeli, A. and Yuan, J. X. (2011) American Journal of Physiology-Cell Physiology theme: ion channels and transporters in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**: C253-254.

Armstrong, C. M., Bezanilla, F. and Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol* **62**: 375-391.

Aronson, P. S., Nee, J. and Suhm, M. A. (1982) Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* **299**: 161-163.

Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K. M. and Mueller, S. C. (2006) Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* **66**: 3034-3043.

Artym, V. V., Matsumoto, K., Mueller, S. C. and Yamada, K. M. (2011) Dynamic membrane remodeling at invadopodia differentiates invadopodia from podosomes. *Eur J Cell Biol* **90**: 172-180.

Attanasio, F., Caldieri, G., Giacchetti, G., van Horssen, R., Wieringa, B. and Buccione, R. (2011) Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *Eur J Cell Biol* **90**: 115-127.

Badowski, C., Pawlak, G., Grichine, A., Chabadel, A., Oddou, C., Jurdic, P., Pfaff, M., Albiges-Rizo, C. and Block, M. R. (2008) Paxillin phosphorylation controls invadopodia/podosomes spatiotemporal organization. *Mol Biol Cell* **19**: 633-645.

Baird, N. R., Orlowski, J., Szabo, E. Z., Zaun, H. C., Schultheis, P. J., Menon, A. G. and Shull, G. E. (1999) Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na+/H+ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* **274**: 4377-4382.

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. *Biochim Biophys 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. *Mol Biol Cell* **14**: 1074-1084.

Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**: 3151-3161.

Barrett, A. J. and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 535-561.

Bartosova, M., Parkkila, S., Pohlodek, K., Karttunen, T. J., Galbavy, S., Mucha, V., Harris, A. L., Pastorek, J. and Pastorekova, S. (2002) Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2. *J Pathol* **197**: 314-321.

Baumgartner, M., Patel, H. and Barber, D. L. (2004) Na(+)/H(+) exchanger NHE1 as plasma membrane scaffold in the assembly of signaling complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C844-850.

Baysal, B. E. (2003) On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 453-459.

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.

Becker, H. M., Hirnet, D., Fecher-Trost, C., Sultemeyer, D. and Deitmer, J. W. (2005) Transport activity of MCT1 expressed in Xenopus oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *J Biol Chem* **280**: 39882-39889.

Becker, H. M. and Deitmer, J. W. (2008) Nonenzymatic proton handling by carbonic anhydrase II during H+-lactate cotransport via monocarboxylate transporter 1. *J Biol Chem* **283**: 21655-21667.

Becker, H. M., Klier, M. and Deitmer, J. W. (2010) Nonenzymatic augmentation of lactate transport via monocarboxylate transporter isoform 4 by carbonic anhydrase II. *J Membr Biol* **234**: 125-135.

Becker, H. M., Klier, M., Schuler, C., McKenna, R. and Deitmer, J. W. (2011) Intramolecular proton shuttle supports not only catalytic but also noncatalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 3071-3076.

Bellocq, A., Suberville, S., Philippe, C., Bertrand, F., Perez, J., Fouqueray, B., Cherqui, G. and Baud, L. (1998) Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* **273**: 5086-5092.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jougla, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A. V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A. M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schvartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L. and Velten, M. (2008) Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**: 159-175.

Beneski, D. A. and Catterall, W. A. (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 639-643.

Bennett, E. S., Smith, B. A. and Harper, J. M. (2004) Voltage-gated Na+ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* **447**: 908-914.

Bertrand, B., Wakabayashi, S., Ikeda, T., Pouyssegur, J. and Shigekawa, M. (1994) The Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* **269**: 13703-13709.

Beyenbach, K. W. and Wieczorek, H. (2006) The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209**: 577-589.

Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**: 555-592.

Bianchini, L., L'Allemain, G. and Pouyssegur, J. (1997) The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na+/H+ exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* **272**: 271-279.

Binks, M., Jones, G. E., Brickell, P. M., Kinnon, C., Katz, D. R. and Thrasher, A. J. (1998) Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* **28**: 3259-3267.

Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J. A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**: 197-250.

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 Res Mol Brain Res* **34**: 89-98.

Black, J. A. and Waxman, S. G. (2012) Sodium channels and microglial function. *Exp Neurol* **234**: 302-315.

Blasi, F. and Sidenius, N. (2010) The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* **584**: 1923-1930.

Bloustine, J., Berejnov, V. and Fraden, S. (2003) Measurements of protein-protein interactions by size exclusion chromatography. *Biophys J* **85**: 2619-2623.

Blouw, B., Seals, D. F., Pass, I., Diaz, B. and Courtneidge, S. A. (2008) A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol* **87**: 555-567.

Bonuccelli, G., Tsirigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R. G., Chiavarina, B., Frank, P. G., Flomenberg, N., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F. and Lisanti, M. P. (2010) Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* **9**: 3506-3514.

Boron, W. F. and De Weer, P. (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO2, NH3, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* **67**: 91-112.

Bougnoux, P., Hajjaji, N. and Couet, C. (2008) The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**: 93-96.

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M. N., Giraudeau, B., Couet, C. and Le Floch, O. (2009) Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* **101**: 1978-1985.

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C. and Chevalier, S. (2010) Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* **49**: 76-86.

Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R. and Gilad, E. (2004) CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* **279**: 26991-27007.

Bowden, E. T., Onikoyi, E., Slack, R., Myoui, A., Yoneda, T., Yamada, K. M. and Mueller, S. C. (2006) Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* **312**: 1240-1253.

Boyd, N. F., Rommens, J. M., Vogt, K., Lee, V., Hopper, J. L., Yaffe, M. J. and Paterson, A. D. (2005) Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol* **6**: 798-808.

Boyer, M. J. and Tannock, I. F. (1992) Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res* **52**: 4441-4447.

Brackenbury, W. J. and Isom, L. L. (2011) Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* **2**: 53.

Brand, K. A. and Hermfisse, U. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb J* **11**: 388-395.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. and Jordans, S. (2008) Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* **90**: 194-207.

Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W. and Mueller-Klieser, W. (2001) Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**: 349-353.

Brooks, G. A. (2000) Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc* **32**: 790-799.

Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E. and Hall, D. M. (2010) Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* **112**: 3-25.

Broomand, A., Mannikko, R., Larsson, H. P. and Elinder, F. (2003) Molecular movement of the voltage sensor in a K channel. *J Gen Physiol* **122**: 741-748.

Brown, D., Gluck, S. and Hartwig, J. (1987) Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H+ATPase. *J Cell Biol* **105**: 1637-1648.

Buccione, R., Orth, J. D. and McNiven, M. A. (2004) Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 647-657.

Bueno, V., Binet, I., Steger, U., Bundick, R., Ferguson, D., Murray, C., Donald, D. and Wood, K. (2007) The specific monocarboxylate transporter (MCT1) inhibitor, AR-C117977, a novel immunosuppressant, prolongs allograft survival in the mouse. *Transplantation* **84**: 1204-1207.

Bullis, B. L., Li, X., Singh, D. N., Berthiaume, L. G. and Fliegel, L. (2002) Properties of the Na+/H+ exchanger protein. Detergent-resistant aggregation and membrane microdistribution. *Eur J Biochem* **269**: 4887-4895.

Bumke, M. A., Neri, D. and Elia, G. (2003) Modulation of gene expression by extracellular pH variations in human fibroblasts: a transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* **3**: 675-688.

Burgstaller, G. and Gimona, M. (2005) Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H3001-3005.

Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. and Jones, G. E. (2001) Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**: 1142-1149.

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. and Reshkin, S. J. (2010) NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *Faseb J*

Cailleau, R., Young, R., Olive, M. and Reeves, W. J., Jr. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* **53**: 661-674.

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.

Calaghan, S., Kozera, L. and White, E. (2008) Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* **45**: 88-92.

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**: 1728-1740.

Cantrell, A. R., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1999) Voltage-dependent neuromodulation of Na+ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**: 5301-5310.

Cardone, R. A., Bagorda, A., Bellizzi, A., Busco, G., Guerra, L., Paradiso, A., Casavola, V., Zaccolo, M. and Reshkin, S. J. (2005a) Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell* **16**: 3117-3127.

Cardone, R. A., Casavola, V. and Reshkin, S. J. (2005b) The role of disturbed pH dynamics and the Na+/H+ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* **5**: 786-795.

Cardone, R. A., Busco, G., Greco, M. R., Bellizzi, A., Accardi, R., Cafarelli, A., Monterisi, S., Carratu, P., Casavola, V., Paradiso, A., Tommasino, M. and Reshkin, S. J. (2008) HPV16 E7-dependent transformation activates NHE1 through a PKA-RhoA-induced inhibition of p38alpha. *PLoS One* **3**: e3529.

Carman, C. V. (2009) Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci* **122**: 3025-3035.

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.

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.

Casey, J. R., Grinstein, S. and Orlowski, J. (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 50-61.

Catterall, W. A. (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* **55**: 953-985.

Catterall, W. A. (2010a) Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neurosci Lett* **486**: 107-116.

Catterall, W. A. (2010b) Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* **67**: 915-928.

Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 118-132.

Cestele, S. and Catterall, W. A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **82**: 883-892.

Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2006) Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J Biol Chem* **281**: 21332-21344.

Chambrey, R., St John, P. L., Eladari, D., Quentin, F., Warnock, D. G., Abrahamson, D. R., Podevin, R. A. and Paillard, M. (2001) Localization and functional characterization of Na+/H+ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F707-717.

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. *Circ Res* **86**: 441-447.

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. and Maity, A. (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* **276**: 9519-9525.

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., Kazarinova-Noyes, K., Shrager, P., Saunders, T. L., Macdonald, R. L., Ransom, B. R., Scheuer, T., Catterall, W. A. and Isom, L. L. (2002) Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17072-17077.

Chen, L. M., Choi, I., Haddad, G. G. and Boron, W. F. (2007a) Chronic continuous hypoxia decreases the expression of SLC4A7 (NBCn1) and SLC4A10 (NCBE) in mouse brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**: R2412-2420.

Chen, Y., Choong, L. Y., Lin, Q., Philp, R., Wong, C. H., Ang, B. K., Tan, Y. L., Loh, M. C., Hew, C. L., Shah, N., Druker, B. J., Chong, P. K. and Lim, Y. P. (2007b) Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Mol Cell Proteomics* **6**: 2072-2087.

Chia, S. K., Wykoff, C. C., Watson, P. H., Han, C., Leek, R. D., Pastorek, J., Gatter, K. C., Ratcliffe, P. and Harris, A. L. (2001) Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* **19**: 3660-3668.

Chiamvimonvat, N., Kargacin, M. E., Clark, R. B. and Duff, H. J. (1995) Effects of intracellular calcium on sodium current density in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Physiol* **483 (Pt 2)**: 307-318.

Chiang, Y., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Huang, Y. F. and Shen, M. R. (2008) EGF upregulates Na+/H+ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. *J Cell Physiol* **214**: 810-819.

Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M. C. and Pouyssegur, J. (2009a) Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul* **50**: 20-33.

Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C. and Pouyssegur, J. (2009b) Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* **69**: 358-368.

Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C. and Pouyssegur, J. (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* **14**: 771-794.

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+ channel beta1 subunit. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1216-1227.

Chioni, A. M., Shao, D., Grose, R. and Djamgoz, M. B. (2010) Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 346-358.

Chiu, S. Y., Schrager, P. and Ritchie, J. M. (1984) Neuronal-type Na+ and K+ channels in rabbit cultured Schwann cells. *Nature* **311**: 156-157.

Chong, J. A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuller, Y. M., Frohman, M. A., Kraner, S. D. and Mandel, G. (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* **80**: 949-957.

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L. and Cantley, L. C. (2008a) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**: 230-233.

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M. and Cantley, L. C. (2008b) Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* **452**: 181-186.

Cianchi, F., Vinci, M. C., Supuran, C. T., Peruzzi, B., De Giuli, P., Fasolis, G., Perigli, G., Pastorekova, S., Papucci, L., Pini, A., Masini, E. and Puccetti, L. (2010) Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* **334**: 710-719.

Cifone, M. A. and Fidler, I. J. (1981) Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6949-6952.

Cipriano, D. J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K. C., Qi, J. and Forgac, M. (2008) Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 599-604.

Clark, E. S., Brown, B., Whigham, A. S., Kochaishvili, A., Yarbrough, W. G. and Weaver, A. M. (2009) Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* **28**: 431-444.

Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J. and Planus, E. (2006) Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci* **119**: 1914-1925.

Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M. E., Wang, F. and Wang, N. (2008) Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol* **18**: 1288-1294.

Collins, V. P., Loeffler, R. K. and Tivey, H. (1956) Observations on growth rates of human tumors. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **76**: 988-1000.

Copley, R. R. (2004) Evolutionary convergence of alternative splicing in ion channels. *Trends Genet* **20**: 171-176.

Cordat, E. and Casey, J. R. (2009) Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochem J* **417**: 423-439.

Cordon-Cardo, C. and Prives, C. (1999) At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med* **190**: 1367-1370.

Cori, C. F. (1981) The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. *Curr Top Cell Regul* **18**: 377-387.

Counillon, L., Pouyssegur, J. and Reithmeier, R. A. (1994) The Na+/H+ exchanger NHE-1 possesses N- and O-linked glycosylation restricted to the first N-terminal extracellular domain. *Biochemistry* **33**: 10463-10469.

Counillon, L., Noel, J., Reithmeier, R. A. and Pouyssegur, J. (1997) Random mutagenesis reveals a novel site involved in inhibitor interaction within the fourth transmembrane segment of the Na+/H+ exchanger-1. *Biochemistry* **36**: 2951-2959.

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.

Cronk, L. B., Ye, B., Kaku, T., Tester, D. J., Vatta, M., Makielski, J. C. and Ackerman, M. J. (2007) Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* **4**: 161-166.

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.

D'Arcangelo, D., Facchiano, F., Barlucchi, L. M., Melillo, G., Illi, B., Testolin, L., Gaetano, C. and Capogrossi, M. C. (2000) Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and

induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* **86**: 312-318.

David-Pfeuty, T. and Singer, S. J. (1980) Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6687-6691.

Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Kristensen, G. B. and Reich, R. (2003) EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* **20**: 161-169.

Davison, Z., de Blacquiere, G. E., Westley, B. R. and May, F. E. (2011) Insulin-like growth factor-dependent proliferation and survival of triple-negative breast cancer cells: implications for therapy. *Neoplasia* **13**: 504-515.

De Milito, A., Canese, R., Marino, M. L., Borghi, M., Iero, M., Villa, A., Venturi, G., Lozupone, F., Iessi, E., Logozzi, M., Della Mina, P., Santinami, M., Rodolfo, M., Podo, F., Rivoltini, L. and Fais, S. (2010) pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* **127**: 207-219.

de Oliveira, A. T., Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Brito, M. J., Martinho, O., Matos, D., Carvalho, A. L., Vazquez, V. L., Silva, T. B., Scapulatempo, C., Saad, S. S., Reis, R. M. and Baltazar, F. (2012) Co-expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its chaperone (CD147) is associated with low survival in patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Bioenerg Biomembr* **44**: 171-178.

DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S. and Thompson, C. B. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19345-19350.

DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Zhao, Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2008) Disulfide locking a sodium channel voltage sensor reveals ion pair formation during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15142-15147.

DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Sharp, E. M., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2009) Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 22498-22503.

DeCaen, P. G., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2011) Gating charge interactions with the S1 segment during activation of a Na+ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 18825-18830.

DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. and Cahalan, M. D. (1985) Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes. *J Neuroimmunol* **10**: 71-95.

Dellian, M., Helmlinger, G., Yuan, F. and Jain, R. K. (1996) Fluorescence ratio imaging of interstitial pH in solid tumours: effect of glucose on spatial and temporal gradients. *Br J Cancer* **74**: 1206-1215.

Demicheli, R., Retsky, M. W., Hrushesky, W. J., Baum, M. and Gukas, I. D. (2008) The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol* **19**: 1821-1828.

Denker, S. P., Huang, D. C., Orlowski, J., Furthmayr, H. and Barber, D. L. (2000) Direct binding of the Na--H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell* **6**: 1425-1436.

Denker, S. P. and Barber, D. L. (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* **159**: 1087-1096.

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. *Circ Res* **90**: E49-57.

Dhup, S., Dadhich, R. K., Porporato, P. E. and Sonveaux, P. (2012) Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* **18**: 1319-1330.

Di Sario, A., Bendia, E., Svegliati Baroni, G., Ridolfi, F., Bolognini, L., Feliciangeli, G., Jezequel, A. M., Orlandi, F. and Benedetti, A. (1999) Intracellular pathways mediating Na+/H+ exchange activation by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **116**: 1155-1166.

Di Sario, A., Bendia, E., Omenetti, A., De Minicis, S., Marzioni, M., Kleemann, H. W., Candelaresi, C., Saccomanno, S., Alpini, G. and Benedetti, A. (2007) Selective inhibition of ion transport mechanisms regulating intracellular pH reduces proliferation and induces apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Dig Liver Dis* **39**: 60-69.

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. *J Cell Physiol* **210**: 469-478.

Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L. A., Oefner, P. J., Andreesen, R., Gottfried, E. and Kreutz, M. P. (2010) Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol* **184**: 1200-1209.

Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W. and Broer, S. (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* **350 Pt 1**: 219-227.

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. *Prostate* **48**: 165-178.

Diss, J. K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C. S., Walker, M. M., Patel, A. and Djamgoz, M. B. (2005) A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **8**: 266-273.

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 Prostatic Dis* **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. *J Cell Sci* **114**: 2697-2705.

Doppler, W., Jaggi, R. and Groner, B. (1987) Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinisation and cell-cycle progression. *Gene* **54**: 147-153.

Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.

Du, Z. M., Hu, C. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Kou, C. W., Zhu, X. F., Zeng, Y. X. and Shao, J. Y. (2009) Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients. *Int J Cancer* **125**: 1832-1841.

Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N. G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., Carta, F., McIntyre, A., Scozzafava, A., Dogne, J. M., Supuran, C. T., Harris, A. L., Masereel, B. and Lambin, P. (2011) Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol* **99**: 424-431.

Duff, H. J., Offord, J., West, J. and Catterall, W. A. (1992) Class I and IV antiarrhythmic drugs and cytosolic calcium regulate mRNA encoding the sodium channel alpha subunit in rat cardiac muscle. *Mol Pharmacol* **42**: 570-574.

Duggan, S. P., Gallagher, W. M., Fox, E. J., Abdel-Latif, M. M., Reynolds, J. V. and Kelleher, D. (2006) Low pH induces co-ordinate regulation of gene expression in oesophageal cells. *Carcinogenesis* **27**: 319-327.

Dyck, J. R., Maddaford, T. G., Pierce, G. N. and Fliegel, L. (1995) Induction of expression of the sodium-hydrogen exchanger in rat myocardium. *Cardiovasc Res* **29**: 203-208.

Eaholtz, G., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1994) Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* **12**: 1041-1048.

Eble, J. A. and Tuckwell, D. S. (2003) The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. *Biochem J* **376**: 77-85.

Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161-174.

Ekberg, H., Qi, Z., Pahlman, C., Veress, B., Bundick, R. V., Craggs, R. I., Holness, E., Edwards, S., Murray, C. M., Ferguson, D., Kerry, P. J., Wilson, E. and Donald, D. K. (2007) The specific monocarboxylate transporter-1 (MCT-1) inhibitor, AR-C117977, induces donor-specific suppression, reducing acute and chronic allograft rejection in the rat. *Transplantation* **84**: 1191-1199.

Elinder, F., Nilsson, J. and Arhem, P. (2007) On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* **92**: 1-7.

Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M. and Thompson, C. B. (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**: 3892-3899.

Fafournoux, P., Noel, J. and Pouyssegur, J. (1994) Evidence that Na+/H+ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J Biol Chem* **269**: 2589-2596.

Farber, E. (1984) The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* **44**: 4217-4223.

Favia, M., Guerra, L., Fanelli, T., Cardone, R. A., Monterisi, S., Di Sole, F., Castellani, S., Chen, M., Seidler, U., Reshkin, S. J., Conese, M. and Casavola, V. (2009) Na+/H+ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- cells. *Mol Biol Cell* **21**: 73-86.

Feng, Y. and Forgac, M. (1992a) Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H+)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem* **267**: 5817-5822.

Feng, Y. and Forgac, M. (1992b) A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J Biol Chem* **267**: 19769-19772.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**: 2893-2917.

Feron, O. (2009) Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* **92**: 329-333.

Few, W. P., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2007) Dopamine modulation of neuronal Na(+) channels requires binding of A kinase-anchoring protein 15 and PKA by a modified leucine zipper motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5187-5192.

Fidler, I. J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.

Fischer, B., Muller, B., Fisch, P. and Kreutz, W. (2000) An acidic microenvironment inhibits antitumoral non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity: implications for cancer immunotherapy. *J Immunother* **23**: 196-207.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W. and Kreutz, M. (2007) Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**: 3812-3819.

Fisher, B., Gunduz, N. and Saffer, E. A. (1983) Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res* **43**: 1488-1492.

Fisher, B., Wolmark, N., Fisher, E. R. and Deutsch, M. (1985) Lumpectomy and axillary dissection for breast cancer: surgical, pathological, and radiation considerations. *World J Surg* **9**: 692-698.

Fisher, B., Gunduz, N., Coyle, J., Rudock, C. and Saffer, E. (1989) Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice. *Cancer Res* **49**: 1996-2001.

Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L. and Sikes, R. A. (2006) Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 493-500.

Fliegel, L., Walsh, M. P., Singh, D., Wong, C. and Barr, A. (1992) Phosphorylation of the C-terminal domain of the Na+/H+ exchanger by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* **282 (Pt 1)**: 139-145.

Fliegel, L., Haworth, R. S. and Dyck, J. R. (1993) Characterization of the placental brush border membrane Na+/H+ exchanger: identification of thiol-dependent transitions in apparent molecular size. *Biochem J* **289 (Pt 1)**: 101-107.

Fliegel, L. and Wang, H. (1997) Regulation of the Na+/H+ exchanger in the mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 1991-1999.

Fliegel, L. (2005) The Na+/H+ exchanger isoform 1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 33-37.

Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D. T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M. D., Struewing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T. R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B. A., Gayther, S. A., Zelada-Hedman, M. and et al. (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* **62**: 676-689.

Forgac, M. (1989) Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* **69**: 765-796.

Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 917-929.

Forouzanfar, M. H., Foreman, K. J., Delossantos, A. M., Lozano, R., Lopez, A. D., Murray, C. J. and Naghavi, M. (2011) Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **378**: 1461-1484.

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. *J Biol Chem* **279**: 28930-28935.

Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* **14**: 327-339.

Fozzard, H. A. and Lipkind, G. M. (2010) The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar Drugs* **8**: 219-234.

Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R. G. (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* **269**: 30745-30748.

Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbaker, E. V. and Villa, L. (1996) Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp Cell Res* **226**: 387-397.

Frantz, C., Karydis, A., Nalbant, P., Hahn, K. M. and Barber, D. L. (2007) Positive feedback between Cdc42 activity and H+ efflux by the Na-H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells. *J Cell Biol* **179**: 403-410.

Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, 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., Ding, Y., Liu, A., Foster, C. S. and Djamgoz, M. B. (1999) Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res* **295**: 505-512.

Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R. J. and Djamgoz, M. B. (2003) Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* **195**: 479-487.

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+ channel activity. *FEBS Lett* **569**: 191-194.

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., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D. S., Coombes, R. C. and Djamgoz, M. B. (2005) Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* **11**: 5381-5389.

Fraser, S. P. and Pardo, L. A. (2008) Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Rep* **9**: 512-515.

Freund, A., Chauveau, C., Brouillet, J. P., Lucas, A., Lacroix, M., Licznar, A., Vignon, F. and Lazennec, G. (2003) IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 256-265.

Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362-374.

Friedl, P. and Wolf, K. (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* **188**: 11-19.

Friedl, P. and Alexander, S. (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**: 992-1009.

Froberg, M. K., Gerhart, D. Z., Enerson, B. E., Manivel, C., Guzman-Paz, M., Seacotte, N. and Drewes, L. R. (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* **12**: 761-765.

Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B. and Jain, R. K. (2001) Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* **61**: 6020-6024.

Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M. V., Miceli, F., Amoroso, S., Annunziato, L., Procopio, A. and Taglialatela, M. (2006) Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 1146-1159.

Fuster, D., Moe, O. W. and Hilgemann, D. W. (2004) Lipid- and mechanosensitivities of sodium/hydrogen exchangers analyzed by electrical methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10482-10487.

Fuster, D., Moe, O. W. and Hilgemann, D. W. (2008) Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na/H exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with 2Na/2H stoichiometry. *J Gen Physiol* **132**: 465-480.

Gallagher, E. J. and LeRoith, D. (2011) Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* **1243**: 54-68.

Gallagher, F. A., Kettunen, M. I., Day, S. E., Hu, D. E., Ardenkjaer-Larsen, J. H., Zandt, R., Jensen, P. R., Karlsson, M., Golman, K., Lerche, M. H. and Brindle, K. M. (2008) Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized 13C-labelled bicarbonate. *Nature* **453**: 940-943.

Gallagher, S. M., Castorino, J. J., Wang, D. and Philp, N. J. (2007) Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res* **67**: 4182-4189.

Gambhir, S. S. (2002) Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2**: 683-693.

Gandhi, C. S., Clark, E., Loots, E., Pralle, A. and Isacoff, E. Y. (2003) The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain. *Neuron* **40**: 515-525.

Garnovskaya, M. N., Mukhin, Y. V., Vlasova, T. M. and Raymond, J. R. (2003) Hypertonicity activates Na+/H+ exchange through Janus kinase 2 and calmodulin. *J Biol Chem* **278**: 16908-16915.

Gaspar, R., Jr., Weidema, A. F., Krasznai, Z., Nijweide, P. J. and Ypey, D. L. (1995) Tetrodotoxin-sensitive fast Na+ current in embryonic chicken osteoclasts. *Pflugers Arch* **430**: 596-598.

Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**: 891-899.

Gatenby, R. A., Smallbone, K., Maini, P. K., Rose, F., Averill, J., Nagle, R. B., Worrall, L. and Gillies, R. J. (2007) Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* **97**: 646-653.

Gavillet, B., Rougier, J. S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H. A., Pedrazzini, T. and Abriel, H. (2006) Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res* **99**: 407-414.

Generali, D., Fox, S. B., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Wigfield, S. M., Bruzzi, P., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., Dogliotti, L., Bottini, A. and Harris, A. L. (2006) Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **13**: 921-930.

Gil-Henn, H., Patsialou, A., Wang, Y., Warren, M. S., Condeelis, J. S. and Koleske, A. J. (2012) Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. *Oncogene*

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.

Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S. and Bhujwalla, Z. M. (2002) MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* **16**: 430-450.

Gillis, D., Shrode, L. D., Krump, E., Howard, C. M., Rubie, E. A., Tibbles, L. A., Woodgett, J. and Grinstein, S. (2001) Osmotic stimulation of the Na+/H+ exchanger NHE1: relationship to the activation of three MAPK pathways. *J Membr Biol* **181**: 205-214.

Gilmour, K. M. (2010) Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **157**: 193-197.

Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Yamaguchi, H., Wang, Y., Roussos, E. T. and Condeelis, J. (2012) N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci* **125**: 724-734.

Glunde, K., Guggino, S. E., Solaiyappan, M., Pathak, A. P., Ichikawa, Y. and Bhujwalla, Z. M. (2003) Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. *Neoplasia* **5**: 533-545.

Goetz, R., Dover, K., Laezza, F., Shtraizent, N., Huang, X., Tchetchik, D., Eliseenkova, A. V., Xu, C. F., Neubert, T. A., Ornitz, D. M., Goldfarb, M. and Mohammadi, M. (2009) Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHFs for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* **284**: 17883-17896.

Goldin, A. L., Snutch, T., Lubbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L. C., Lester, H. A., Dunn, R. and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7503-7507.

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., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N. and Catterall, W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**: 365-368.

Goldin, A. L. (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **63**: 871-894.

Gordienko, D. V. and Tsukahara, H. (1994) Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar arter and human umbilical vein. *Pflugers Arch* **428**: 91-93.

Gore, J., Besson, P., Hoinard, C. and Bougnoux, P. (1994) Na(+)-H+ antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am J Physiol* **266**: C110-120.

Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., Stanley, E. R., Segall, J. E. and Condeelis, J. S. (2005) Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* **65**: 5278-5283.

Grabmaier, K., MC, A. d. W., Verhaegh, G. W., Schalken, J. A. and Oosterwijk, E. (2004) Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* **23**: 5624-5631.

Grichtchenko, II, Choi, I., Zhong, X., Bray-Ward, P., Russell, J. M. and Boron, W. F. (2001) Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO3 exchanger. *J Biol Chem* **276**: 8358-8363.

Grillon, E., Farion, R., Fablet, K., De Waard, M., Tse, C. M., Donowitz, M., Remy, C. and Coles, J. A. (2011) The spatial organization of proton and lactate transport in a rat brain tumor. *PLoS One* **6**: e17416.

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+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* **369**: 290-294.

Grimes, J. A. and Djamgoz, M. B. (1998) Electrophysiological characterization of voltage-gated Na+ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* **175**: 50-58.

Grinstein, S., Rotin, D. and Mason, M. J. (1989) Na+/H+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* **988**: 73-97.

Grinstein, S., Woodside, M., Sardet, C., Pouyssegur, J. and Rotin, D. (1992) Activation of the Na+/H+ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* **267**: 23823-23828.

Grinstein, S., Woodside, M., Waddell, T. K., Downey, G. P., Orlowski, J., Pouyssegur, J., Wong, D. C. and Foskett, J. K. (1993) Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na+/H+ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *Embo J* **12**: 5209-5218.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883-899.

Group, E. B. C. T. C. (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**: 1687-1717.

Gumina, R. J., Buerger, E., Eickmeier, C., Moore, J., Daemmgen, J. and Gross, G. J. (1999) Inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* **100**: 2519-2526; discussion 2469-2572.

Guo, M., Mathieu, P. A., Linebaugh, B., Sloane, B. F. and Reiners, J. J., Jr. (2002) Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-betaL a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. *J Biol Chem* **277**: 14829-14837.

Guo, W. and Giancotti, F. G. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 816-826.

Gupta, P. B., Chaffer, C. L. and Weinberg, R. A. (2009) Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* **15**: 1010-1012.

Gustafsson, M. G. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* **198**: 82-87.

Gustafsson, M. G., Shao, L., Carlton, P. M., Wang, C. J., Golubovskaya, I. N., Cande, W. Z., Agard, D. A. and Sedat, J. W. (2008) Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* **94**: 4957-4970.

Guy, H. R. and Seetharamulu, P. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 508-512.

Ha, T. K., Her, N. G., Lee, M. G., Ryu, B. K., Lee, J. H., Han, J., Jeong, S. I., Kang, M. J., Kim, N. H., Kim, H. J. and Chi, S. G. (2012) Caveolin-1 Increases Aerobic Glycolysis in Colorectal Cancers by Stimulating HMGA1-Mediated GLUT3 Transcription. *Cancer Res* **72**: 4097-4109.

Haapasalo, J., Hilvo, M., Nordfors, K., Haapasalo, H., Parkkila, S., Hyrskyluoto, A., Rantala, I., Waheed, A., Sly, W. S., Pastorekova, S., Pastorek, J. and Parkkila, A. K. (2008) Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas. *Neuro Oncol* **10**: 131-138.

Haapasalo, J. A., Nordfors, K. M., Hilvo, M., Rantala, I. J., Soini, Y., Parkkila, A. K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S. M. and Haapasalo, H. K. (2006) Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res* **12**: 473-477.

Hagag, N., Lacal, J. C., Graber, M., Aaronson, S. and Viola, M. V. (1987) Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* **7**: 1984-1988.

Halestrap, A. P. and Price, N. T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343 Pt 2**: 281-299.

Halestrap, A. P. and Meredith, D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* **447**: 619-628.

Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P. C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D. W., Wells, K. S., Zhou, J., Yi, J. and Murray, K. T. (2006) Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res* **72**: 250-261.

Halsted, W. S. (1907) I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg* **46**: 1-19.

Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**: 929-942.

Harguindey, S., Orive, G., Luis Pedraz, J., Paradiso, A. and Reshkin, S. J. (2005) The role of pH dynamics and the Na+/H+ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochim Biophys Acta* **1756**: 1-24.

Harguindey, S., Arranz, J. L., Wahl, M. L., Orive, G. and Reshkin, S. J. (2009) Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res* **29**: 2127-2136.

Harris, C. C. (1991) Molecular basis of multistage carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp* **22**: 3-19.

Hartshorne, R. P. and Catterall, W. A. (1984) The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J Biol Chem* **259**: 1667-1675.

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.

Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K. and Brooks, G. A. (2007) Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *Faseb J* **21**: 2602-2612.

Hawkins, R. A. and Phelps, M. E. (1988) PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Rev* **7**: 119-142.

Haworth, R. S., McCann, C., Snabaitis, A. K., Roberts, N. A. and Avkiran, M. (2003) Stimulation of the plasma membrane Na+/H+ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem* **278**: 31676-31684.

Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. and Numa, S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**: 441-443.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. and Jain, R. K. (1997) Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**: 177-182.

Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N. S. and Jain, R. K. (2002) Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* **8**: 1284-1291.

Helms, J. B. and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5**: 247-254.

Heming, T. A., Dave, S. K., Tuazon, D. M., Chopra, A. K., Peterson, J. W. and Bidani, A. (2001) Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor-alpha production by resident alveolar macrophages. *Clin Sci (Lond)* **101**: 267-274.

Herzog, R. I., Liu, C., Waxman, S. G. and Cummins, T. R. (2003) Calmodulin binds to the C terminus of sodium channels Nav1.4 and Nav1.6 and differentially modulates their functional properties. *J Neurosci* **23**: 8261-8270.

Hinton, A., Sennoune, S. R., Bond, S., Fang, M., Reuveni, M., Sahagian, G. G., Jay, D., Martinez-Zaguilan, R. and Forgac, M. (2009) Function of a subunit isoforms of the V-

ATPase in pH homeostasis and in vitro invasion of MDA-MB231 human breast cancer cells. *J Biol Chem* **284**: 16400-16408.

Hirata, T., Iwamoto-Kihara, A., Sun-Wada, G. H., Okajima, T., Wada, Y. and Futai, M. (2003) Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J Biol Chem* **278**: 23714-23719.

Hisamitsu, T., Pang, T., Shigekawa, M. and Wakabayashi, S. (2004) Dimeric interaction between the cytoplasmic domains of the Na+/H+ exchanger NHE1 revealed by symmetrical intermolecular cross-linking and selective co-immunoprecipitation. *Biochemistry* **43**: 11135-11143.

Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M. M., Yoshida, S. and Noda, M. (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* **5**: 511-512.

Hlubek, F., Brabletz, T., Budczies, J., Pfeiffer, S., Jung, A. and Kirchner, T. (2007) Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *Int J Cancer* **121**: 1941-1948.

Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**: 500-544.

Horvat, B., Taheri, S. and Salihagic, A. (1992) Tumour cell proliferation is abolished by inhibitors of Na+/H+ and HCO3-/Cl- exchange. *Eur J Cancer* **29A**: 132-137.

Hotary, K., Li, X. Y., Allen, E., Stevens, S. L. and Weiss, S. J. (2006) A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* **20**: 2673-2686.

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., Stuart, J. M. and Lee, N. H. (2010) Voltage-gated Na+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* **70**: 6957-6967.

Hsieh, M. J., Chen, K. S., Chiou, H. L. and Hsieh, Y. S. (2010) Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway. *Eur J Cell Biol* **89**: 598-606.

Huang, B., El-Sherif, T., Gidh-Jain, M., Qin, D. and El-Sherif, N. (2001) Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol* **12**: 218-225.

Huang, C. J., Haque, I. U., Slovin, P. N., Nielsen, R. B., Fang, X. and Skimming, J. W. (2002) Environmental pH regulates LPS-induced nitric oxide formation in murine macrophages. *Nitric Oxide* **6**: 73-78.

Huber, V., De Milito, A., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Wahl, M. L., Rauch, C., Chiesi, A., Pouyssegur, J., Gatenby, R. A., Rivoltini, L. and Fais, S. (2010) Proton dynamics in cancer. *J Transl Med* **8**: 57.

Huc, L., Tekpli, X., Holme, J. A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M. T. and Lagadic-Gossmann, D. (2007) c-Jun NH2-terminal kinase-related Na+/H+ exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer Res* **67**: 1696-1705.

Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E. and Michel, H. (2005) Structure of a Na+/H+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**: 1197-1202.

Husemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G. and Klein, C. A. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**: 58-68.

Hussain, S. A., Ganesan, R., Reynolds, G., Gross, L., Stevens, A., Pastorek, J., Murray, P. G., Perunovic, B., Anwar, M. S., Billingham, L., James, N. D., Spooner, D., Poole, C. J., Rea, D. W. and Palmer, D. H. (2007) Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is

associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer* **96**: 104-109.

Hwang, J. M., Kao, S. H., Hsieh, Y. H., Li, K. L., Wang, P. H., Hsu, L. S. and Liu, J. Y. (2009) Reduction of anion exchanger 2 expression induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cell Biochem* **327**: 135-144.

Ilie, M. I., Hofman, V., Ortholan, C., Ammadi, R. E., Bonnetaud, C., Havet, K., Venissac, N., Mouroux, J., Mazure, N. M., Pouyssegur, J. and Hofman, P. (2010) Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int J Cancer* **128**: 1614-1623.

Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. and Yokoyama, K. (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2312-2315.

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* **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. (1995a) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**: 433-442.

Isom, L. L., Scheuer, T., Brownstein, A. B., Ragsdale, D. S., Murphy, B. J. and Catterall, W. A. (1995b) Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *J Biol Chem* **270**: 3306-3312.

Ivanov, S., Liao, S. Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Merrill, M. J., Proescholdt, M. A., Oldfield, E. H., Lee, J., Zavada, J., Waheed, A., Sly, W., Lerman, M. I. and Stanbridge, E. J. (2001) Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* **158**: 905-919.

Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J. and Lerman, M. I. (1998) Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12596-12601.

Ives, H. E., Yee, V. J. and Warnock, D. G. (1983) Mixed type inhibition of the renal Na+/H+ antiporter by Li+ and amiloride. Evidence for a modifier site. *J Biol Chem* **258**: 9710-9716.

Iwasaki, T., Nakata, A., Mukai, M., Shinkai, K., Yano, H., Sabe, H., Schaefer, E., Tatsuta, M., Tsujimura, T., Terada, N., Kakishita, E. and Akedo, H. (2002) Involvement of phosphorylation of Tyr-31 and Tyr-118 of paxillin in MM1 cancer cell migration. *Int J Cancer* **97**: 330-335.

Izumi, H., Takahashi, M., Uramoto, H., Nakayama, Y., Oyama, T., Wang, K. Y., Sasaguri, Y., Nishizawa, S. and Kohno, K. (2011) Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer Sci* **102**: 1007-1013.

Jahde, E. and Rajewsky, M. F. (1982) Tumor-selective modification of cellular microenvironment in vivo: effect of glucose infusion on the pH in normal and malignant rat tissues. *Cancer Res* **42**: 1505-1512.

Jain, R. K., Shah, S. A. and Finney, P. L. (1984) Continuous noninvasive monitoring of pH and temperature in rat Walker 256 carcinoma during normoglycemia and hyperglycemia. *J Natl Cancer Inst* **73**: 429-436.

Jakobisiak, M., Lasek, W. and Golab, J. (2003) Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* **90**: 103-122.

Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. and Forgac, M. (2008) Function, structure and regulation of the vacuolar (H+)-ATPases. *Arch Biochem Biophys* **476**: 33-42.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69-90.

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. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 1455-1462.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. and MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. *Nature* **423**: 42-48.

Junttila, M. R. and Evan, G. I. (2009) p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* **9**: 821-829.

Kang, L., Zheng, M. Q., Morishima, M., Wang, Y., Kaku, T. and Ono, K. (2009) Bepridil up-regulates cardiac Na+ channels as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity. *Br J Pharmacol* **157**: 404-414.

Kaplan, D. L. and Boron, W. F. (1994) Long-term expression of c-H-ras stimulates Na-H and Na(+)-dependent Cl-HCO3 exchange in NIH-3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **269**: 4116-4124.

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S. and Lyden, D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820-827.

Karnoub, A. E. and Weinberg, R. A. (2006) Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* **26**: 75-85.

Karumanchi, S. A., Jiang, L., Knebelmann, B., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L. and Sukhatme, V. P. (2001) VHL tumor suppressor regulates Cl-/HCO3- exchange and Na+/H+ exchange activities in renal carcinoma cells. *Physiol Genomics* **5**: 119-128.

Kato, Y., Lambert, C. A., Colige, A. C., Mineur, P., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J. M., Baba, M., Hata, R., Miyazaki, K. and Tsukuda, M. (2005) Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **280**: 10938-10944.

Kaur, J. S. (2000) Migration patterns and breast carcinoma. *Cancer* **88**: 1203-1206.

Kellenberger, S., West, J. W., Catterall, W. A. and Scheuer, T. (1997) Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na+ channels. *J Gen Physiol* **109**: 607-617.

Kellum, J. A., Song, M. and Li, J. (2004) Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Crit Care* **8**: 331-336.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**: 52-67.

Key, T. J., Verkasalo, P. K. and Banks, E. (2001) Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* **2**: 133-140.

Khadilkar, A., Iannuzzi, P. and Orlowski, J. (2001) Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na+/H+ exchanger important for drug recognition and cation translocation. *J Biol Chem* **276**: 43792-43800.

Khaled, A. R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K. and Durum, S. K. (1999) Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14476-14481.

Khaled, A. R., Moor, A. N., Li, A., Kim, K., Ferris, D. K., Muegge, K., Fisher, R. J., Fliegel, L. and Durum, S. K. (2001) Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. *Mol Cell Biol* **21**: 7545-7557.

Kim, H. S., Kim do, H., Kim, J. Y., Jeoung, N. H., Lee, I. K., Bong, J. G. and Jung, E. D. (2010) Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern Med* **25**: 399-407.

Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R. S. and Pitt, G. S. (2004) Calmodulin mediates Ca2+ sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem* **279**: 45004-45012.

Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. and Dang, C. V. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**: 177-185.

Kirk, P., Wilson, M. C., Heddle, C., Brown, M. H., Barclay, A. N. and Halestrap, A. P. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *Embo J* **19**: 3896-3904.

Klein, C. A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H. and Riethmuller, G. (2002) Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683-689.

Klein, C. A. (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**: 302-312.

Klein, M., Seeger, P., Schuricht, B., Alper, S. L. and Schwab, A. (2000) Polarization of Na(+)/H(+) and Cl(-)/HCO (3)(-) exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol* **115**: 599-608.

Kocher, H. M., Sandle, J., Mirza, T. A., Li, N. F. and Hart, I. R. (2009) Ezrin interacts with cortactin to form podosomal rosettes in pancreatic cancer cells. *Gut* **58**: 271-284.

Kondo, A., Safaei, R., Mishima, M., Niedner, H., Lin, X. and Howell, S. B. (2001) Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* **61**: 7603-7607.

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. *J Gen Physiol* **110**: 391-401.

Koster, S., Pavkov-Keller, T., Kuhlbrandt, W. and Yildiz, O. (2011) Structure of human Na+/H+ exchanger NHE1 regulatory region in complex with calmodulin and Ca2+. *J Biol Chem* **286**: 40954-40961.

Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H. and Baici, A. (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* **455**: 286-290.

Kraemer, K. H., Lee, M. M. and Scotto, J. (1987) Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* **123**: 241-250.

Krahling, H., Mally, S., Eble, J. A., Noel, J., Schwab, A. and Stock, C. (2009) The glycocalyx maintains a cell surface pH nanoenvironment crucial for integrin-mediated migration of human melanoma cells. *Pflugers Arch* **458**: 1069-1083.

Kubota, S. and Seyama, Y. (2000) Overexpression of vacuolar ATPase 16-kDa subunit in 10T1/2 fibroblasts enhances invasion with concomitant induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 390-394.

Kumar, A. P., Quake, A. L., Chang, M. K., Zhou, T., Lim, K. S., Singh, R., Hewitt, R. E., Salto-Tellez, M., Pervaiz, S. and Clement, M. V. (2009) Repression of NHE1 expression by PPARgamma activation is a potential new approach for specific inhibition of the growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **69**: 8636-8644.

Kunzelmann, K. (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**: 159-173.

Kurashima, K., D'Souza, S., Szaszi, K., Ramjeesingh, R., Orlowski, J. and Grinstein, S. (1999) The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **274**: 29843-29849.

Kusuhara, M., Takahashi, E., Peterson, T. E., Abe, J., Ishida, M., Han, J., Ulevitch, R. and Berk, B. C. (1998) p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na+/H+ exchange and ERK1/2. *Circ Res* **83**: 824-831.

Kuwata, F., Suzuki, N., Otsuka, K., Taguchi, M., Sasai, Y., Wakino, H., Ito, M., Ebihara, S. and Suzuki, K. (1991) Enzymatic regulation of glycolysis and gluconeogenesis in rabbit periodontal ligament under various physiological pH conditions. *J Nihon Univ Sch Dent* **33**: 81-90.

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 Rep* **5**: 91-96.

Lacroix, J., Poet, M., Huc, L., Morello, V., Djerbi, N., Ragno, M., Rissel, M., Tekpli, X., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D. and Counillon, L. (2008) Kinetic analysis of the regulation of the Na+/H+ exchanger NHE-1 by osmotic shocks. *Biochemistry* **47**: 13674-13685.

Lagadic-Gossmann, D., Huc, L. and Lecureur, V. (2004) Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* **11**: 953-961.

Lagana, A., Vadnais, J., Le, P. U., Nguyen, T. N., Laprade, R., Nabi, I. R. and Noel, J. (2000) Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na(+)/H(+) exchanger NHE1. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**: 3649-3662.

Lagarde, A. E., Franchi, A. J., Paris, S. and Pouyssegur, J. M. (1988) Effect of mutations affecting Na+: H+ antiport activity on tumorigenic potential of hamster lung fibroblasts. *J Cell Biochem* **36**: 249-260.

Lamb, J. A., Allen, P. G., Tuan, B. Y. and Janmey, P. A. (1993) Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca2+ requirement. *J Biol Chem* **268**: 8999-9004.

Landau, M., Herz, K., Padan, E. and Ben-Tal, N. (2007) Model structure of the Na+/H+ exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. *J Biol Chem* **282**: 37854-37863.

Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhangal, G., Djamgoz, M. B. and Abel, P. D. (1997) Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* **150**: 1213-1221.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A. and Dick, J. E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645-648.

Lardner, A. (2001) The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* **69**: 522-530.

Larsen, A. K., Escargueil, A. E. and Skladanowski, A. (2000) Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* **85**: 217-229.

Lauritzen, G., Jensen, M. B., Boedtkjer, E., Dybboe, R., Aalkjaer, C., Nylandsted, J. and Pedersen, S. F. (2010) NBCn1 and NHE1 expression and activity in DeltaNErbB2 receptor-expressing MCF-7 breast cancer cells: contributions to pHi regulation and chemotherapy resistance. *Exp Cell Res* **316**: 2538-2553.

Le Guennec, J. Y., Ouadid-Ahidouch, H., Soriani, O., Besson, P., Ahidouch, A. and Vandier, C. (2007) Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**: 189-202.

Lee, B. L., Sykes, B. D. and Fliegel, L. (2011) Structural analysis of the Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1) using the divide and conquer approach. *Biochem Cell Biol* **89**: 189-199.

Lee, C. H. and Ruben, P. C. (2008) Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)* **2**: 407-412.

Lee, S. H., Kim, T., Park, E. S., Yang, S., Jeong, D., Choi, Y. and Rho, J. (2008) NHE10, an osteoclast-specific member of the Na+/H+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 320-326.

Lee, S. Y., Banerjee, A. and MacKinnon, R. (2009) Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol* **7**: e47.

Lehen'kyi, V., Shapovalov, G., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2011) Ion channnels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**: C1281-1289.

Lehenkari, P. P. and Horton, M. A. (1999) Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 645-650.

Lehoux, S., Abe, J., Florian, J. A. and Berk, B. C. (2001) 14-3-3 Binding to Na+/H+ exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na+/H+ exchange. *J Biol Chem* **276**: 15794-15800.

Lemaillet, G., Walker, B. and Lambert, S. (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* **278**: 27333-27339.

Li, X., Alvarez, B., Casey, J. R., Reithmeier, R. A. and Fliegel, L. (2002) Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na+/H+ exchanger. *J Biol Chem* **277**: 36085-36091.

Li, X., Liu, Y., Kay, C. M., Muller-Esterl, W. and Fliegel, L. (2003) The Na+/H+ exchanger cytoplasmic tail: structure, function, and interactions with tescalcin. *Biochemistry* **42**: 7448-7456.

Li, X., Liu, Y., Alvarez, B. V., Casey, J. R. and Fliegel, L. (2006) A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity. *Biochemistry* **45**: 2414-2424.

Li, Y., Wang, H., Oosterwijk, E., Tu, C., Shiverick, K. T., Silverman, D. N. and Frost, S. C. (2009) Expression and activity of carbonic anhydrase IX is associated with metabolic dysfunction in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Invest* **27**: 613-623.

Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H. and Vignon, F. (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* **237**: 167-179.

Liaw, Y. S., Yang, P. C., Yu, C. J., Kuo, S. H., Luh, K. T., Lin, Y. J. and Wu, M. L. (1998) PKC activation is required by EGF-stimulated Na(+)-H+ exchanger in human pleural mesothelial cells. *Am J Physiol* **274**: L665-672.

Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. and Aepfelbacher, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9648-9653.

Linder, S. (2009) Invadosomes at a glance. *J Cell Sci* **122**: 3009-3013.

Linder, S., Wiesner, C. and Himmel, M. (2011) Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 185-211.

Linford, N. J., Cantrell, A. R., Qu, Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1998) Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in transmembrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13947-13952.

Litwin, M., Nowak, D., Mazur, A. J., Baczynska, D., Mannherz, H. G. and Malicka-Blaszkiewicz, M. (2012) Gelsolin affects the migratory ability of human colon adenocarcinoma and melanoma cells. *Life Sci* **90**: 851-861.

Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R. and Waxman, S. G. (2003) Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem* **278**: 1029-1036.

Liu, C. J., Hwang, J. M., Wu, T. T., Hsieh, Y. H., Wu, C. C., Hsieh, Y. S., Tsai, C. H., Wu, H. C., Huang, C. Y. and Liu, J. Y. (2008) Anion exchanger inhibitor DIDS induces human poorly-differentiated malignant hepatocellular carcinoma HA22T cell apoptosis. *Mol Cell Biochem* **308**: 117-125.

Liu, H., Sun, H. Y., Lau, C. P. and Li, G. R. (2007a) Regulation of voltage-gated cardiac sodium current by epidermal growth factor receptor kinase in guinea pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 760-768.

Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K. and Clarke, M. F. (2007b) The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* **356**: 217-226.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.

Lizarraga, F., Poincloux, R., Romao, M., Montagnac, G., Le Dez, G., Bonne, I., Rigaill, G., Raposo, G. and Chavrier, P. (2009) Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res* **69**: 2792-2800.

Loeffler, D. A., Juneau, P. L. and Heppner, G. H. (1991) Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. *Int J Cancer* **48**: 895-899.

Loncaster, J. A., Harris, A. L., Davidson, S. E., Logue, J. P., Hunter, R. D., Wycoff, C. C., Pastorek, J., Ratcliffe, P. J., Stratford, I. J. and West, C. M. (2001) Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* **61**: 6394-6399.

London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., Viswanathan, P. C., Pfahnl, A. E., Shang, L. L., Madhusudanan, M., Baty, C. J., Lagana, S., Aleong, R., Gutmann, R., Ackerman, M. J., McNamara, D. M., Weiss, R. and Dudley, S. C., Jr. (2007) Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na+ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* **116**: 2260-2268.

Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A. D., Berrendero, J. R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C. and Cuezva, J. M. (2007) Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* **67**: 9013-9017.

Lou, Y., McDonald, P. C., Oloumi, A., Chia, S., Ostlund, C., Ahmadi, A., Kyle, A., Auf dem Keller, U., Leung, S., Huntsman, D., Clarke, B., Sutherland, B. W., Waterhouse, D., Bally, M., Roskelley, C., Overall, C. M., Minchinton, A., Pacchiano, F., Carta, F., Scozzafava, A., Touisni, N., Winum, J. Y., Supuran, C. T. and Dedhar, S. (2011) Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res* **71**: 3364-3376.

Lu, H., Forbes, R. A. and Verma, A. (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **277**: 23111-23115.

Lu, H., Dalgard, C. L., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A. S. and Verma, A. (2005a) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* **280**: 41928-41939.

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. *J Physiol* **518 (Pt 2)**: 371-384.

Lu, X., Qin, W., Li, J., Tan, N., Pan, D., Zhang, H., Xie, L., Yao, G., Shu, H., Yao, M., Wan, D., Gu, J. and Yang, S. (2005b) The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Res* **65**: 6843-6849.

Lu, Y., Yi, Y., Liu, P., Wen, W., James, M., Wang, D. and You, M. (2007) Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis. *PLoS One* **2**: e1149.

Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F. and Fais, S. (2004) Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1702-1713.

Ludwig, M. G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R. M. and Seuwen, K. (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* **425**: 93-98.

Luo, J. and Tannock, I. F. (1994) Inhibition of the regulation of intracellular pH: potential of 5-(N,N-hexamethylene) amiloride in tumour-selective therapy. *Br J Cancer* **70**: 617-624.

Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F. and Groom, A. C. (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* **153**: 865-873.

Ma, Y. H., Reusch, H. P., Wilson, E., Escobedo, J. A., Fantl, W. J., Williams, L. T. and Ives, H. E. (1994) Activation of Na+/H+ exchange by platelet-derived growth factor involves phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C gamma. *J Biol Chem* **269**: 30734-30739.

Maekawa, N., Abe, J., Shishido, T., Itoh, S., Ding, B., Sharma, V. K., Sheu, S. S., Blaxall, B. C. and Berk, B. C. (2006) Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents (Na+)-H+ exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **113**: 2516-2523.

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.

Malakooti, J., Dahdal, R. Y., Schmidt, L., Layden, T. J., Dudeja, P. K. and Ramaswamy, K. (1999) Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression of the human Na(+)/H(+) exchanger NHE2. *Am J Physiol* **277**: G383-390.

Malik-Hall, M., Poon, W. Y., Baker, M. D., Wood, J. N. and Okuse, K. (2003) Sensory neuron proteins interact with the intracellular domains of sodium channel NaV1.8. *Brain Res Mol Brain Res* **110**: 298-304.

Malo, M. E. and Fliegel, L. (2006) Physiological role and regulation of the Na+/H+ exchanger. *Can J Physiol Pharmacol* **84**: 1081-1095.

Manabe, T., Yoshimori, T., Henomatsu, N. and Tashiro, Y. (1993) Inhibitors of vacuolar-type H(+)-ATPase suppresses proliferation of cultured cells. *J Cell Physiol* **157**: 445-452.

Mankoff, D. A., Eary, J. F., Link, J. M., Muzi, M., Rajendran, J. G., Spence, A. M. and Krohn, K. A. (2007) Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* **13**: 3460-3469.

Marionnet, C., Lalou, C., Mollier, K., Chazal, M., Delestaing, G., Compan, D., Verola, O., Vilmer, C., Cuminet, J., Dubertret, L. and Basset-Seguin, N. (2003) Differential molecular profiling between skin carcinomas reveals four newly reported genes potentially implicated in squamous cell carcinoma development. *Oncogene* **22**: 3500-3505.

Martin, C., Pedersen, S. F., Schwab, A. and Stock, C. (2011) Intracellular pH gradients in migrating cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**: C490-495.

Martin, N. K., Gaffney, E. A., Gatenby, R. A. and Maini, P. K. (2010) Tumour-stromal interactions in acid-mediated invasion: a mathematical model. *J Theor Biol* **267**: 461-470.

Martinez-Outschoorn, U. E., Pavlides, S., Howell, A., Pestell, R. G., Tanowitz, H. B., Sotgia, F. and Lisanti, M. P. (2011) Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 1045-1051.

Martinez-Zaguilan, R. and Gillies, R. J. (1992) A plasma membrane V-type H(+)-ATPase may contribute to elevated intracellular pH (pHin) in some human tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* **671**: 478-480.

Martinez-Zaguilan, R., Lynch, R. M., Martinez, G. M. and Gillies, R. J. (1993) Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol* **265**: C1015-1029.

Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J. and Hendrix, M. J. (1996) Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14**: 176-186.

Martinez-Zaguilan, R., Martinez, G. M., Gomez, A., Hendrix, M. J. and Gillies, R. J. (1998) Distinct regulation of pHin and [Ca2+]in in human melanoma cells with different metastatic potential. *J Cell Physiol* **176**: 196-205.

Maseide, K., Kandel, R. A., Bell, R. S., Catton, C. N., O'Sullivan, B., Wunder, J. S., Pintilie, M., Hedley, D. and Hill, R. P. (2004) Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* **10**: 4464-4471.

Masereel, B., Pochet, L. and Laeckmann, D. (2003) An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem* **38**: 547-554.

Mason, S. D. and Joyce, J. A. (2011) Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol* **21**: 228-237.

Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y. and Reed, J. C. (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**: 318-325.

Mazzone, A., Strege, P. R., Tester, D. J., Bernard, C. E., Faulkner, G., De Giorgio, R., Makielski, J. C., Stanghellini, V., Gibbons, S. J., Ackerman, M. J. and Farrugia, G. (2008) A mutation in telethonin alters Nav1.5 function. *J Biol Chem* **283**: 16537-16544.

McEwen, D. P., Chen, C., Meadows, L. S., Lopez-Santiago, L. and Isom, L. L. (2009) The voltage-gated Na+ channel beta3 subunit does not mediate trans homophilic cell adhesion or associate with the cell adhesion molecule contactin. *Neurosci Lett* **462**: 272-275.

McIntyre, A., Patiar, S., Wigfield, S., Li, J. L., Ledaki, I., Turley, H., Leek, R., Snell, C., Gatter, K., Sly, W. S., Vaughan-Jones, R. D., Swietach, P. and Harris, A. L. (2012) Carbonic Anhydrase IX Promotes Tumor Growth and Necrosis In Vivo and Inhibition Enhances Anti-VEGF Therapy. *Clin Cancer Res* **18**: 3100-3111.

McLean, L. A., Roscoe, J., Jorgensen, N. K., Gorin, F. A. and Cala, P. M. (2000) Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C676-688.

Meima, M. E., Webb, B. A., Witkowska, H. E. and Barber, D. L. (2009) The sodium-hydrogen exchanger NHE1 is an Akt substrate necessary for actin filament reorganization by growth factors. *J Biol Chem* **284**: 26666-26675.

Mencia, N., Selga, E., Noe, V. and Ciudad, C. J. (2011) Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* **82**: 1572-1582.

Mentzer, R. M., Jr., Bartels, C., Bolli, R., Boyce, S., Buckberg, G. D., Chaitman, B., Haverich, A., Knight, J., Menasche, P., Myers, M. L., Nicolau, J., Simoons, M., Thulin, L. and Weisel, R. D. (2008) Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study. *Ann Thorac Surg* **85**: 1261-1270.

Messier, J. M., Shaw, L. M., Chafel, M., Matsudaira, P. and Mercurio, A. M. (1993) Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**: 223-233.

Milosavljevic, N., Duranton, C., Djerbi, N., Puech, P. H., Gounon, P., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M. T., Rauch, C., Tauc, M., Counillon, L. and Poet, M. (2010) Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling. *Cancer Res* **70**: 7514-7522.

Miraglia, E., Viarisio, D., Riganti, C., Costamagna, C., Ghigo, D. and Bosia, A. (2005) Na+/H+ exchanger activity is increased in doxorubicin-resistant human colon cancer cells and its modulation modifies the sensitivity of the cells to doxorubicin. *Int J Cancer* **115**: 924-929.

Misik, A. J., Perreault, K., Holmes, C. F. and Fliegel, L. (2005) Protein phosphatase regulation of Na+/H+ exchanger isoform I. *Biochemistry* **44**: 5842-5852.

Mo, X. G., Chen, Q. W., Li, X. S., Zheng, M. M., Ke, D. Z., Deng, W., Li, G. Q., Jiang, J., Wu, Z. Q., Wang, L., Wang, P., Yang, Y. and Cao, G. Y. (2011) Suppression of NHE1 by small

interfering RNA inhibits HIF-1alpha-induced angiogenesis in vitro via modulation of calpain activity. *Microvasc Res* **81**: 160-168.

Moellering, R. E., Black, K. C., Krishnamurty, C., Baggett, B. K., Stafford, P., Rain, M., Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2008) Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* **25**: 411-425.

Mohamed, M. M. and Sloane, B. F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764-775.

Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H. and Bennett, V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**: 634-639.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17533-17538.

Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I. and Rochefort, H. (1997) Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* **15**: 382-392.

Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E. (2003) Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* **23**: 6809-6822.

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. and Jackson, A. P. (2000) beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2308-2313.

Morgan, P. E., Pastorekova, S., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L. and Casey, J. R. (2007) Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**: C738-748.

Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992) Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res* **268**: 297-305.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.

Mount, D. B. and Romero, M. F. (2004) The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* **447**: 710-721.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E. and Zlotnik, A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50-56.

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 Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.

Mundy, G. R. (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **2**: 584-593.

Murakami, T., Shibuya, I., Ise, T., Chen, Z. S., Akiyama, S., Nakagawa, M., Izumi, H., Nakamura, T., Matsuo, K., Yamada, Y. and Kohno, K. (2001) Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* **93**: 869-874.

Murphy, D. A. and Courtneidge, S. A. (2011) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 413-426.

Murtazina, R., Booth, B. J., Bullis, B. L., Singh, D. N. and Fliegel, L. (2001) Functional analysis of polar amino-acid residues in membrane associated regions of the NHE1 isoform of the mammalian Na+/H+ exchanger. *Eur J Biochem* **268**: 4674-4685.

Mycielska, M. E., Fraser, S. P., Szatkowski, M. and Djamgoz, M. B. (2003) Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* **195**: 461-469.

Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K. and Kanazawa, H. (2005) Four Na+/H+ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* **280**: 1561-1572.

Naudin, C., Lecaille, F., Chowdhury, S., Krupa, J. C., Purisima, E., Mort, J. S. and Lalmanach, G. (2010) The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J Mol Biol* **400**: 1022-1035.

Neri, D. and Supuran, C. T. (2011) Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 767-777.

Newell, K., Franchi, A., Pouyssegur, J. and Tannock, I. (1993) Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1127-1131.

Nguyen, T. N., Wang, H. J., Zalzal, S., Nanci, A. and Nabi, I. R. (2000) Purification and characterization of beta-actin-rich tumor cell pseudopodia: role of glycolysis. *Exp Cell Res* **258**: 171-183.

Nishisho, T., Hata, K., Nakanishi, M., Morita, Y., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Yasui, N. and Yoneda, T. (2011) The a3 isoform vacuolar type H(+)-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Mol Cancer Res* **9**: 845-855.

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., Suzuki, H., Numa, S. and Stuhmer, W. (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* **259**: 213-216.

Noguchi, T. and Arakawa, O. (2008) Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar Drugs* **6**: 220-242.

Nolop, K. B., Rhodes, C. G., Brudin, L. H., Beaney, R. P., Krausz, T., Jones, T. and Hughes, J. M. (1987) Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer* **60**: 2682-2689.

Nordfors, K., Haapasalo, J., Korja, M., Niemela, A., Laine, J., Parkkila, A. K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., Parkkila, S. and Haapasalo, H. (2010) The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer* **10**: 148.

Nordstrom, T., Rotstein, O. D., Romanek, R., Asotra, S., Heersche, J. N., Manolson, M. F., Brisseau, G. F. and Grinstein, S. (1995) Regulation of cytoplasmic pH in osteoclasts. Contribution of proton pumps and a proton-selective conductance. *J Biol Chem* **270**: 2203-2212.

Nygaard, E. B., Lagerstedt, J. O., Bjerre, G., Shi, B., Budamagunta, M., Poulsen, K. A., Meinild, S., Rigor, R. R., Voss, J. C., Cala, P. M. and Pedersen, S. F. (2010) Structural modeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy of the human Na+/H+ exchanger isoform 1, NHE1. *J Biol Chem* **286**: 634-648.

Ober, S. S. and Pardee, A. B. (1987) Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2766-2770.

Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W. Y., Kong, H., Chao, M. V. and Wood, J. N. (2002) Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* **417**: 653-656.

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. *J Cell Physiol* **216**: 716-726.

Ono, K., Fozzard, H. A. and Hanck, D. A. (1993) Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics. *Circ Res* **72**: 807-815.

Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., Wada, H., Matsuura, N. and Sabe, H. (2005) Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *Embo J* **24**: 963-973.

Oreffo, R. O., Teti, A., Triffitt, J. T., Francis, M. J., Carano, A. and Zallone, A. Z. (1988) Effect of vitamin A on bone resorption: evidence for direct stimulation of isolated chicken osteoclasts by retinol and retinoic acid. *J Bone Miner Res* **3**: 203-210.

Orive, G., Reshkin, S. J., Harguindey, S. and Pedraz, J. L. (2003) Hydrogen ion dynamics and the Na+/H+ exchanger in cancer angiogenesis and antiangiogenesis. *Br J Cancer* **89**: 1395-1399.

Orlowski, J., Kandasamy, R. A. and Shull, G. E. (1992) Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* **267**: 9331-9339.

Orlowski, J. and Grinstein, S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* **447**: 549-565.

Ortega, A. D., Sanchez-Arago, M., Giner-Sanchez, D., Sanchez-Cenizo, L., Willers, I. and Cuezva, J. M. (2009) Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett* **276**: 125-135.

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.

Ostrom, R. S. and Liu, X. (2007) Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods Mol Biol* **400**: 459-468.

Overall, C. M. and Kleifeld, O. (2006) Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**: 227-239.

Pacchiano, F., Carta, F., McDonald, P. C., Lou, Y., Vullo, D., Scozzafava, A., Dedhar, S. and Supuran, C. T. (2011) Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J Med Chem* **54**: 1896-1902.

Paget, S. (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**: 98-101.

Pan, P., Leppilampi, M., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S. and Parkkila, S. (2006) Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (Car2-/-) and CA IX-deficient (Car9-/-) mice. *J Physiol* **571**: 319-327.

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 Res* **49**: 5901-5906.

Pang, T., Wakabayashi, S. and Shigekawa, M. (2002) Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na+/H+ exchanger. *J Biol Chem* **277**: 43771-43777.

Pang, T., Hisamitsu, T., Mori, H., Shigekawa, M. and Wakabayashi, S. (2004) Role of calcineurin B homologous protein in pH regulation by the Na+/H+ exchanger 1: tightly bound Ca2+ ions as important structural elements. *Biochemistry* **43**: 3628-3636.

Pang, V., Counillon, L., Lagadic-Gossmann, D., Poet, M., Lacroix, J., Sergent, O., Khan, R. and Rauch, C. (2012) On the role of the difference in surface tensions involved in the allosteric

regulation of NHE-1 induced by low to mild osmotic pressure, membrane tension and lipid asymmetry. *Cell Biochem Biophys* **63**: 47-57.

Pantel, K., Cote, R. J. and Fodstad, O. (1999) Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1113-1124.

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 Metab* **3**: 187-197.

Paradiso, A., Cardone, R. A., Bellizzi, A., Bagorda, A., Guerra, L., Tommasino, M., Casavola, V. and Reshkin, S. J. (2004) The Na+-H+ exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res* **6**: R616-628.

Parekh, A. and Weaver, A. M. (2009) Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment. *Cell Adh Migr* **3**: 288-292.

Parekh, A., Ruppender, N. S., Branch, K. M., Sewell-Loftin, M. K., Lin, J., Boyer, P. D., Candiello, J. E., Merryman, W. D., Guelcher, S. A. and Weaver, A. M. (2011) Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys J* **100**: 573-582.

Paris, S. and Pouyssegur, J. (1983) Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na+/H+ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* **258**: 3503-3508.

Paris, S. and Pouyssegur, J. (1984) Growth factors activate the Na+/H+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H+. *J Biol Chem* **259**: 10989-10994.

Park, H. J., Lyons, J. C., Ohtsubo, T. and Song, C. W. (1999) Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* **80**: 1892-1897.

Parkins, C. S., Stratford, M. R., Dennis, M. F., Stubbs, M. and Chaplin, D. J. (1997) The relationship between extracellular lactate and tumour pH in a murine tumour model of ischaemia-reperfusion. *Br J Cancer* **75**: 319-323.

Parkkila, A. K., Herva, R., Parkkila, S. and Rajaniemi, H. (1995) Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours. *Histochem J* **27**: 974-982.

Parkkila, S., Lasota, J., Fletcher, J. A., Ou, W. B., Kivela, A. J., Nuorva, K., Parkkila, A. K., Ollikainen, J., Sly, W. S., Waheed, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., Isola, J. and Miettinen, M. (2010) Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* **23**: 743-750.

Parks, S. K., Chiche, J. and Pouyssegur, J. (2011) pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* **226**: 299-308.

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. and Kinzler, K. W. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**: 1807-1812.

Parton, R. G. (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* **42**: 155-166.

Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J. and Supuran, C. T. (2004) Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem* **19**: 199-229.

Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A. and Weaver, V. M. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**: 241-254.

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. and Isom, L. L. (2011) Voltage-gated Na+ channel beta1B: a secreted cell adhesion molecule involved in human epilepsy. *J Neurosci* **31**: 14577-14591.

Patra, S. K. and Bettuzzi, S. (2007) Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). *Oncol Rep* **17**: 1279-1290.

Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. and Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**: 353-358.

Payandeh, J., Gamal El-Din, T. M., Scheuer, T., Zheng, N. and Catterall, W. A. (2012) Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* **486**: 135-139.

Peak, M., al-Habori, M. and Agius, L. (1992) Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalinization in mediating the effects of insulin. *Biochem J* **282 (Pt 3)**: 797-805.

Pedersen, S. F. (2006) The Na+/H+ exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflugers Arch* **452**: 249-259.

Peinado, H., Lavotshkin, S. and Lyden, D. (2011) The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* **21**: 139-146.

Pellerin, L. (2003) Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* **43**: 331-338.

Perona, R. and Serrano, R. (1988) Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* **334**: 438-440.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. and Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752.

Pertega-Gomes, N., Vizcaino, J. R., Miranda-Goncalves, V., Pinheiro, C., Silva, J., Pereira, H., Monteiro, P., Henrique, R. M., Reis, R. M., Lopes, C. and Baltazar, F. (2011) Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* **11**: 312.

Petitprez, S., Zmoos, A. F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S. E., Hatem, S. N., Coulombe, A. and Abriel, H. (2011) SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res* **108**: 294-304.

Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D. F., Evans, C., Deacon, J. and Stratton, M. R. (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**: 943-949.

Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**: 655-667.

Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Simoes, K., Jacob, C. E., Bresciani, C. J., Zilberstein, B., Cecconello, I., Alves, V. A., Schmitt, F. and Baltazar, F. (2009) The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *Eur J Cancer* **45**: 2418-2424.

Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K. and Ingber, D. E. (1995) Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell* **6**: 1349-1365.

Plummer, N. W. and Meisler, M. H. (1999) Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* **57**: 323-331.

Poincloux, R., Lizarraga, F. and Chavrier, P. (2009) Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* **122**: 3015-3024.

Pollard, P. J., Wortham, N. C. and Tomlinson, I. P. (2003) The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med* **35**: 632-639.

Poole, R. C., Sansom, C. E. and Halestrap, A. P. (1996) Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H+/lactate cotransporter (MCT1). *Biochem J* **320 (Pt 3)**: 817-824.

Poon, W. Y., Malik-Hall, M., Wood, J. N. and Okuse, K. (2004) Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11. *FEBS Lett* **558**: 114-118.

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. *Front Pharmacol* **2**: 49.

Potter, C. and Harris, A. L. (2004) Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* **3**: 164-167.

Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G. and Paris, S. (1984) A specific mutation abolishing Na+/H+ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4833-4837.

Pouyssegur, J., Franchi, A. and Pages, G. (2001) pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* **240**: 186-196; discussion 196-188.

Pouyssegur, J., Dayan, F. and Mazure, N. M. (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-443.

Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y. (2010) Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* **16**: 107-121.

Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D. and Daniels, L. M. (1990) Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* **50**: 717-721.

Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Knittel, J. G., Yan, L., Rueden, C. T., White, J. G. and Keely, P. J. (2008) Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* **6**: 11.

Putney, L. K., Denker, S. P. and Barber, D. L. (2002) The changing face of the Na+/H+ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 527-552.

Putney, L. K. and Barber, D. L. (2003) Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem* **278**: 44645-44649.

Putney, L. K. and Barber, D. L. (2004) Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1. *BMC Genomics* **5**: 46.

Qian, B. Z. and Pollard, J. W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39-51.

Qin, N., D'Andrea, M. R., Lubin, M. L., Shafaee, 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. *Eur J Biochem* **270**: 4762-4770.

Qu, Y., Rogers, J. C., Tanada, T. N., Catterall, W. A. and Scheuer, T. (1996) Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na+ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol* **108**: 375-379.

Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M. and Mueller-Klieser, W. (2006) Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* **81**: 130-135.

Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G. and Courtneidge, S. A. (2010) MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol* **189**: 13-22.

Ra, H. J. and Parks, W. C. (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* **26**: 587-596.

Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* **5**: 17-23.

Raghu, H., Sodadasu, P. K., Malla, R. R., Gondi, C. S., Estes, N. and Rao, J. S. (2010) Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells. *BMC Cancer* **10**: 647.

Rao, G. N., Sardet, C., Pouyssegur, J. and Berk, B. C. (1992) Na+/H+ antiporter gene expression increases during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL60 cells. *J Cell Physiol* **151**: 361-366.

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. *J Cell Biol* **154**: 427-434.

Raynaud, C. M., Hernandez, J., Llorca, F. P., Nuciforo, P., Mathieu, M. C., Commo, F., Delaloge, S., Sabatier, L., Andre, F. and Soria, J. C. (2010) DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am J Clin Oncol* **33**: 341-345.

Rebillard, A., Tekpli, X., Meurette, O., Sergent, O., LeMoigne-Muller, G., Vernhet, L., Gorria, M., Chevanne, M., Christmann, M., Kaina, B., Counillon, L., Gulbins, E., Lagadic-Gossmann, D. and Dimanche-Boitrel, M. T. (2007) Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res* **67**: 7865-7874.

Reshkin, S. J., Bellizzi, A., Albarani, V., Guerra, L., Tommasino, M., Paradiso, A. and Casavola, V. (2000a) Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na(+)/H(+) exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* **275**: 5361-5369.

Reshkin, S. J., Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V., Malanchi, I., Poignee, M., Alunni-Fabbroni, M., Casavola, V. and Tommasino, M. (2000b) Na+/H+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *Faseb J* **14**: 2185-2197.

Reshkin, S. J., Bellizzi, A., Cardone, R. A., Tommasino, M., Casavola, V. and Paradiso, A. (2003) Paclitaxel induces apoptosis via protein kinase A- and p38 mitogen-activated protein-dependent inhibition of the Na+/H+ exchanger (NHE) NHE isoform 1 in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**: 2366-2373.

Rich, I. N., Worthington-White, D., Garden, O. A. and Musk, P. (2000) Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger. *Blood* **95**: 1427-1434.

Ridley, A. J. (2011) Life at the leading edge. *Cell* **145**: 1012-1022.

Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M. and Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* **5**: 605-607.

Rink, T. J., Tsien, R. Y. and Pozzan, T. (1982) Cytoplasmic pH and free Mg2+ in lymphocytes. *J Cell Biol* **95**: 189-196.

Rios, E. J., Fallon, M., Wang, J. and Shimoda, L. A. (2005) Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na+/H+ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**: L867-874.

Robertson, N., Potter, C. and Harris, A. L. (2004) Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* **64**: 6160-6165.

Robey, I. F., Baggett, B. K., Kirkpatrick, N. D., Roe, D. J., Dosescu, J., Sloane, B. F., Hashim, A. I., Morse, D. L., Raghunand, N., Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2009) Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Res* **69**: 2260-2268.

Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K. and Galappathi, K. (2006) Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* **66**: 6699-6707.

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., Le Guennec, J. Y. and Besson, P. (2004) Particular sensitivity to calcium channel blockers of the fast inward voltage-dependent sodium current involved in the invasive properties of a metastastic breast cancer cell line. *Br J Pharmacol* **141**: 610-615.

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.

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.

Roos, A. and Boron, W. F. (1981) Regulation of intracellular pH in barnacle muscle. *Kroc Found Ser* **15**: 205-219.

Roselli, F., Livrea, P. and Jirillo, E. (2006) Voltage-gated sodium channel blockers as immunomodulators. *Recent Pat CNS Drug Discov* **1**: 83-91.

Rotin, D., Wan, P., Grinstein, S. and Tannock, I. (1987) Cytotoxicity of compounds that interfere with the regulation of intracellular pH: a potential new class of anticancer drugs. *Cancer Res* **47**: 1497-1504.

Rotin, D. and Grinstein, S. (1989) Impaired cell volume regulation in Na(+)-H+ exchange-deficient mutants. *Am J Physiol* **257**: C1158-1165.

Rotin, D., Steele-Norwood, D., Grinstein, S. and Tannock, I. (1989) Requirement of the Na+/H+ exchanger for tumor growth. *Cancer Res* **49**: 205-211.

Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., Reuzeau, E. and Genot, E. (2009) TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *J Cell Sci* **122**: 4311-4318.

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.

Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G. and Sloane, B. F. (1994) Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* **54**: 6517-6525.

Ruan, Y., Denegri, M., Liu, N., Bachetti, T., Seregni, M., Morotti, S., Severi, S., Napolitano, C. and Priori, S. G. (2010) Trafficking defects and gating abnormalities of a novel SCN5A mutation question gene-specific therapy in long QT syndrome type 3. *Circ Res* **106**: 1374-1383.

Saltel, F., Daubon, T., Juin, A., Ganuza, I. E., Veillat, V. and Genot, E. (2011) Invadosomes: intriguing structures with promise. *Eur J Cell Biol* **90**: 100-107.

Samani, A., Zubovits, J. and Plewes, D. (2007) Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Phys Med Biol* **52**: 1565-1576.

Sardet, C., Franchi, A. and Pouyssegur, J. (1989) Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na+/H+ antiporter. *Cell* **56**: 271-280.

Sardet, C., Counillon, L., Franchi, A. and Pouyssegur, J. (1990) Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* **247**: 723-726.

Sardet, C., Fafournoux, P. and Pouyssegur, J. (1991) Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na+/H+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* **266**: 19166-19171.

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* **256**: 1202-1205.

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. *Circ Res* **105**: 523-526.

Scheuer, T. (2011) Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 160-165.

Schlichter, L., Sidell, N. and Hagiwara, S. (1986) Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 451-455.

Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Gottlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., Koprowski, H. and et al. (1987) Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8672-8676.

Schneiderhan, W., Scheler, M., Holzmann, K. H., Marx, M., Gschwend, J. E., Bucholz, M., Gress, T. M., Seufferlein, T., Adler, G. and Oswald, F. (2009) CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut* **58**: 1391-1398.

Schonherr, R. (2005) Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* **205**: 175-184.

Schornack, P. A. and Gillies, R. J. (2003) Contributions of cell metabolism and H+ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* **5**: 135-145.

Schoumacher, 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.

Schoumacher, M., Louvard, D. and Vignjevic, D. (2011) Cytoskeleton networks in basement membrane transmigration. *Eur J Cell Biol* **90**: 93-99.

Schwartz, M. A., Lechene, C. and Ingber, D. E. (1991) Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7849-7853.

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 Res* **55**: 4757-4759.

Semenza, G. L. (1996) Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1 molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Trends Cardiovasc Med* **6**: 151-157.

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. *J Biol Chem* **271**: 32529-32537.

Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-732.

Sennoune, S. R., Bakunts, K., Martinez, G. M., Chua-Tuan, J. L., Kebir, Y., Attaya, M. N. and Martinez-Zaguilan, R. (2004) Vacuolar H+-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C1443-1452.

Severin, T., Muller, B., Giese, G., Uhl, B., Wolf, B., Hauschildt, S. and Kreutz, W. (1994) pH-dependent LAK cell cytotoxicity. *Tumour Biol* **15**: 304-310.

Sgroi, D. C. (2010) Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol* **5**: 193-221.

Shang, L. L. and Dudley, S. C., Jr. (2005) Tandem promoters and developmentally regulated 5'- and 3'-mRNA untranslated regions of the mouse Scn5a cardiac sodium channel. *J Biol Chem* **280**: 933-940.

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. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1471-1481.

Shen, W. W., Wu, J., Cai, L., Liu, B. Y., Gao, Y., Chen, G. Q. and Fu, G. H. (2007) Expression of anion exchanger 1 sequestrates p16 in the cytoplasm in gastric and colonic adenocarcinoma. *Neoplasia* **9**: 812-819.

Shi, Q., Le, X., Wang, B., Abbruzzese, J. L., Xiong, Q., He, Y. and Xie, K. (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* **20**: 3751-3756.

Shimoda, L. A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J. and Semenza, G. L. (2006) HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**: L941-949.

Shimokawa, N., Londono, M. and Koibuchi, N. (2006) Gene expression and signaling pathways by extracellular acidification. *Adv Exp Med Biol* **580**: 267-274; discussion 351-269.

Siczkowski, M., Davies, J. E. and Ng, L. L. (1994) Activity and density of the Na+/H+ antiporter in normal and transformed human lymphocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* **267**: C745-752.

Silva, A. S., Yunes, J. A., Gillies, R. J. and Gatenby, R. A. (2009) The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res* **69**: 2677-2684.

Silva, N. L., Haworth, R. S., Singh, D. and Fliegel, L. (1995) The carboxyl-terminal region of the Na+/H+ exchanger interacts with mammalian heat shock protein. *Biochemistry* **34**: 10412-10420.

Simchowitz, L. and Roos, A. (1985) Regulation of intracellular pH in human neutrophils. *J Gen Physiol* **85**: 443-470.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.

Singh, D., Febbo, P. G., Ross, K., Jackson, D. G., Manola, J., Ladd, C., Tamayo, P., Renshaw, A. A., D'Amico, A. V., Richie, J. P., Lander, E. S., Loda, M., Kantoff, P. W., Golub, T. R. and Sellers, W. R. (2002) Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* **1**: 203-209.

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 Lett* **409**: 49-52.

Slepkov, E. and Fliegel, L. (2004) Regulation of expression of the Na+/H+ exchanger by thyroid hormone. *Vitam Horm* **69**: 249-269.

Slepkov, E. R., Chow, S., Lemieux, M. J. and Fliegel, L. (2004) Proline residues in transmembrane segment IV are critical for activity, expression and targeting of the Na+/H+ exchanger isoform 1. *Biochem J* **379**: 31-38.

Slepkov, E. R., Rainey, J. K., Li, X., Liu, Y., Cheng, F. J., Lindhout, D. A., Sykes, B. D. and Fliegel, L. (2005) Structural and functional characterization of transmembrane segment IV of the NHE1 isoform of the Na+/H+ exchanger. *J Biol Chem* **280**: 17863-17872.

Slepkov, E. R., Rainey, J. K., Sykes, B. D. and Fliegel, L. (2007) Structural and functional analysis of the Na+/H+ exchanger. *Biochem J* **401**: 623-633.

Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., Foekens, J. A. and Martens, J. W. (2008) Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* **68**: 3108-3114.

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 Lett* **423**: 19-24.

Smith, R. D. and Goldin, A. L. (1996) Phosphorylation of brain sodium channels in the I--II linker modulates channel function in Xenopus oocytes. *J Neurosci* **16**: 1965-1974.

Snabaitis, A. K., Yokoyama, H. and Avkiran, M. (2000) Roles of mitogen-activated protein kinases and protein kinase C in alpha(1A)-adrenoceptor-mediated stimulation of the sarcolemmal Na(+)-H(+) exchanger. *Circ Res* **86**: 214-220.

Snabaitis, A. K., D'Mello, R., Dashnyam, S. and Avkiran, M. (2006) A novel role for protein phosphatase 2A in receptor-mediated regulation of the cardiac sarcolemmal Na+/H+ exchanger NHE1. *J Biol Chem* **281**: 20252-20262.

Solomon, K. R. and Freeman, M. R. (2008) Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk? *Trends Endocrinol Metab* **19**: 113-121.

Sommers, C. L., Byers, S. W., Thompson, E. W., Torri, J. A. and Gelmann, E. P. (1994) Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* **31**: 325-335.

Sontheimer, H. and Waxman, S. G. (1992) Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. II. Biophysical and pharmacological analysis of two Na+ current types. *J Neurophysiol* **68**: 1001-1011.

Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O. and Dewhirst, M. W. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* **118**: 3930-3942.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E. and Borresen-Dale, A. L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-10874.

Soule, H. D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1409-1416.

Soule, H. D. and McGrath, C. M. (1980) Estrogen responsive proliferation of clonal human breast carcinoma cells in athymic mice. *Cancer Lett* **10**: 177-189.

Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Jr., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F. and Brooks, S. C. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* **50**: 6075-6086.

Spitznagel, H., Chung, O., Xia, Q., Rossius, B., Illner, S., Jahnichen, G., Sandmann, S., Reinecke, A., Daemen, M. J. and Unger, T. (2000) Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+)-exchange inhibitor cariporide in infarct-induced heart failure. *Cardiovasc Res* **46**: 102-110.

Spugnini, E. P., Citro, G. and Fais, S. (2010) Proton pump inhibitors as anti vacuolar-ATPases drugs: a novel anticancer strategy. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 44.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15753-15757.

Srivastava, J., Barber, D. L. and Jacobson, M. P. (2007) Intracellular pH sensors: design principles and functional significance. *Physiology (Bethesda)* **22**: 30-39.

Steeg, P. S. (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12**: 895-904.

Steffan, J. J., Snider, J. L., Skalli, O., Welbourne, T. and Cardelli, J. A. (2009) Na+/H+ exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. *Traffic* **10**: 737-753.

Steffen, A., Le Dez, G., Poincloux, R., Recchi, C., Nassoy, P., Rottner, K., Galli, T. and Chavrier, P. (2008) MT1-MMP-dependent invasion is regulated by TI-VAMP/VAMP7. *Curr Biol* **18**: 926-931.

Stock, C., Gassner, B., Hauck, C. R., Arnold, H., Mally, S., Eble, J. A., Dieterich, P. and Schwab, A. (2005) Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na+/H+ exchange. *J Physiol* **567**: 225-238.

Stock, C., Mueller, M., Kraehling, H., Mally, S., Noel, J., Eder, C. and Schwab, A. (2007) pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* **20**: 679-686.

Stock, C. and Schwab, A. (2009) Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch* **458**: 981-992.

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.

Stuwe, L., Muller, M., Fabian, A., Waning, J., Mally, S., Noel, J., Schwab, A. and Stock, C. (2007) pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *J Physiol* **585**: 351-360.

Su, J., Chen, X. and Kanekura, T. (2009) A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Lett* **273**: 140-147.

Sugimoto, T., Yoshino, M., Nagao, M., Ishii, S. and Yabu, H. (1996) Voltage-gated ionic channels in cultured rabbit articular chondrocytes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **115**: 223-232.

Sung, Y. M., Xu, X., Sun, J., Mueller, D., Sentissi, K., Johnson, P., Urbach, E., Seillier-Moiseiwitsch, F., Johnson, M. D. and Mueller, S. C. (2009) Tumor suppressor function of Syk in human MCF10A in vitro and normal mouse mammary epithelium in vivo. *PLoS One* **4**: e7445.

Suo, W. H., Zhang, N., Wu, P. P., Zhao, L., Song, L. J., Shen, W. W., Zheng, L., Tao, J., Long, X. D. and Fu, G. H. (2012) Anti-tumour effects of small interfering RNA targeting anion exchanger 1 in experimental gastric cancer. *Br J Pharmacol* **165**: 135-147.

Svastova, E., Zilka, N., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Ciampor, F., Pastorek, J. and Pastorekova, S. (2003) Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res* **290**: 332-345.

Svastova, E., Hulikova, A., Rafajova, M., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J. and Pastorekova, S. (2004) Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* **577**: 439-445.

Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D. and Harris, A. L. (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 299-310.

Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C. T., Harris, A. L. and Vaughan-Jones, R. D. (2009) The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular ph in three-dimensional tumor cell growths. *J Biol Chem* **284**: 20299-20310.

Takahashi, E., Abe, J., Gallis, B., Aebersold, R., Spring, D. J., Krebs, E. G. and Berk, B. C. (1999) p90(RSK) is a serum-stimulated Na+/H+ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na+/H+ exchanger isoform-1. *J Biol Chem* **274**: 20206-20214.

Talmadge, J. E. (2011) Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol* **21**: 131-138.

Tan, H. L., Kupershmidt, S., Zhang, R., Stepanovic, S., Roden, D. M., Wilde, A. A., Anderson, M. E. and Balser, J. R. (2002) A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* **415**: 442-447.

Taouis, M., Sheldon, R. S. and Duff, H. J. (1991) Upregulation of the rat cardiac sodium channel by in vivo treatment with a class I antiarrhythmic drug. *J Clin Invest* **88**: 375-378.

Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F. G., Comoglio, P. M. and Marchisio, P. C. (1985) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* **159**: 141-157.

Tekpli, X., Huc, L., Lacroix, J., Rissel, M., Poet, M., Noel, J., Dimanche-Boitrel, M. T., Counillon, L. and Lagadic-Gossmann, D. (2008) Regulation of Na+/H+ exchanger 1 allosteric balance by its localization in cholesterol- and caveolin-rich membrane microdomains. *J Cell Physiol* **216**: 207-220.

Tennant, D. A., Duran, R. V., Boulahbel, H. and Gottlieb, E. (2009) Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* **30**: 1269-1280.

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 Lett* **293**: 93-96.

Thomsen, P., Rudenko, O., Berezin, V. and Norrild, B. (1999) The HPV-16 E5 oncogene and bafilomycin A(1) influence cell motility. *Biochim Biophys Acta* **1452**: 285-295.

Tibbs, V. C., Gray, P. C., Catterall, W. A. and Murphy, B. J. (1998) AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain sodium channels. *J Biol Chem* **273**: 25783-25788.

Tomashek, J. J. and Brusilow, W. S. (2000) Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 493-500.

Tominaga, T. and Barber, D. L. (1998) Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell* **9**: 2287-2303.

Tominaga, T., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Barber, D. L. (1998) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *Embo J* **17**: 4712-4722.

Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Murakami, T., Ise, T., Yoshida, Y., Tanabe, M., Nomoto, M., Itoh, H. and Kohno, K. (2002) Enhanced expression of the human vacuolar H+-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *J Biol Chem* **277**: 36534-36543.

Touret, N., Poujeol, P. and Counillon, L. (2001) Second-site revertants of a low-sodium-affinity mutant of the Na+/H+ exchanger reveal the participation of TM4 into a highly constrained sodium-binding site. *Biochemistry* **40**: 5095-5101.

Townson, J. L. and Chambers, A. F. (2006) Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* **5**: 1744-1750.

Trainer, V. L., Thomsen, W. J., Catterall, W. A. and Baden, D. G. (1991) Photoaffinity labeling of the brevetoxin receptor on sodium channels in rat brain synaptosomes. *Mol Pharmacol* **40**: 988-994.

Trainer, V. L., Brown, G. B. and Catterall, W. A. (1996) Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit. *J Biol Chem* **271**: 11261-11267.

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. *J Biol Chem* **274**: 20144-20150.

Tresguerres, M., Buck, J. and Levin, L. R. (2010) Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflugers Arch* **460**: 953-964.

Trivedi, B. and Danforth, W. H. (1966) Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J Biol Chem* **241**: 4110-4112.

Tyczynski, J., Tarkowski, W., Parkin, D. M. and Zatonski, W. (1994) Cancer mortality among Polish migrants to Australia. *Eur J Cancer* **30A**: 478-484.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9355-9360.

Ullah, M. S., Davies, A. J. and Halestrap, A. P. (2006) The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* **281**: 9030-9037.

Undrovinas, A. I., Shander, G. S. and Makielski, J. C. (1995) Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol* **269**: H203-214.

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. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H1446-1452.

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. and Friend, S. H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**: 530-536.

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. and Abriel, H. (2004) Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res* **95**: 284-291.

Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charriere, G. M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V. (2011) Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol* **90**: 224-236.

Van Norstrand, D. W., Valdivia, C. R., Tester, D. J., Ueda, K., London, B., Makielski, J. C. and Ackerman, M. J. (2007) Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* **116**: 2253-2259.

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **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* **241**: 1658-1661.

Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Li, Z., Kamp, T. J. and Towbin, J. A. (2006) Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* **114**: 2104-2112.

Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442.

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 Res* **71**: 2550-2560.

Vilin, Y. Y. and Ruben, P. C. (2001) Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem Biophys* **35**: 171-190.

Vincent, T. L. and Gatenby, R. A. (2008) An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol* **32**: 729-737.

Vinciguerra, M., Deschenes, G., Hasler, U., Mordasini, D., Rousselot, M., Doucet, A., Vandewalle, A., Martin, P. Y. and Feraille, E. (2003) Intracellular Na+ controls cell surface expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. *Mol Biol Cell* **14**: 2677-2688.

Vinciguerra, M., Hasler, U., Mordasini, D., Roussel, M., Capovilla, M., Ogier-Denis, E., Vandewalle, A., Martin, P. Y. and Feraille, E. (2005) Cytokines and sodium induce protein kinase A-dependent cell-surface Na,K-ATPase recruitment via dissociation of NF-kappaB/IkappaB/protein kinase A catalytic subunit complex in collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* **16**: 2576-2585.

Volk, T., Jahde, E., Fortmeyer, H. P., Glusenkamp, K. H. and Rajewsky, M. F. (1993) pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* **68**: 492-500.

Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., Bers, D. M. and Maier, L. S. (2006) Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na+ channels. *J Clin Invest* **116**: 3127-3138.

Wain, H. M., Lush, M. J., Ducluzeau, F., Khodiyar, V. K. and Povey, S. (2004) Genew: the Human Gene Nomenclature Database, 2004 updates. *Nucleic Acids Res* **32**: D255-257.

Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet, C. and Pouyssegur, J. (1992) The Na+/H+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2424-2428.

Wakabayashi, S., Bertrand, B., Ikeda, T., Pouyssegur, J. and Shigekawa, M. (1994) Mutation of calmodulin-binding site renders the Na+/H+ exchanger (NHE1) highly H(+)-sensitive and Ca2+ regulation-defective. *J Biol Chem* **269**: 13710-13715.

Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. and Shigekawa, M. (2000a) A novel topology model of the human Na(+)/H(+) exchanger isoform 1. *J Biol Chem* **275**: 7942-7949.

Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. and Shigekawa, M. (2000b) Second mutations rescue point mutant of the Na(+)/H(+) exchanger NHE1 showing defective surface expression. *FEBS Lett* **487**: 257-261.

Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Pang, T. and Shigekawa, M. (2003) Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 oppositely change pH sensing of Na+/H+ exchanger 1. *J Biol Chem* **278**: 11828-11835.

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. *Am J Pathol* **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 Res* **60**: 916-921.

Walenta, S. and Mueller-Klieser, W. F. (2004) Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* **14**: 267-274.

Walenta, S., Schroeder, T. and Mueller-Klieser, W. (2004) Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* **11**: 2195-2204.

Wang, Y. Z. and Xu, T. L. (2011) Acidosis, acid-sensing ion channels, and neuronal cell death. Mol Neurobiol 44: 350-358.

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+ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15426-15431.

Wang, T., Marquardt, C. and Foker, J. (1976) Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* **261**: 702-705.

Wang, X., Wilson, M. J., Slaton, J. W., Sinha, A. A., Ewing, S. L. and Pei, D. (2009) Increased aggressiveness of human prostate PC-3 tumor cells expressing cell surface localized membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Androl* **30**: 259-274.

Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314.

Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C. and Noda, M. (2000) Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J Neurosci* **20**: 7743-7751.

Watson, P. H., Chia, S. K., Wykoff, C. C., Han, C., Leek, R. D., Sly, W. S., Gatter, K. C., Ratcliffe, P. and Harris, A. L. (2003) Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* **88**: 1065-1070.

Weaver, A. M. (2006) Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis* **23**: 97-105.

Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P. and Barber, D. L. (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* **11**: 671-677.

Weber, W. A., Ziegler, S. I., Thodtmann, R., Hanauske, A. R. and Schwaiger, M. (1999) Reproducibility of metabolic measurements in malignant tumors using FDG PET. *J Nucl Med* **40**: 1771-1777.

Wehrens, X. H., Abriel, H., Cabo, C., Benhorin, J. and Kass, R. S. (2000) Arrhythmogenic mechanism of an LQT-3 mutation of the human heart Na(+) channel alpha-subunit: A computational analysis. *Circulation* **102**: 584-590.

Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F., de Jong, D., Van de Vijver, M. J., Van't Veer, L. J. and Peterse, J. L. (2008) Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* **216**: 141-150.

Weiss, R., Barmada, M. M., Nguyen, T., Seibel, J. S., Cavlovich, D., Kornblit, C. A., Angelilli, A., Villanueva, F., McNamara, D. M. and London, B. (2002) Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* **105**: 707-713.

Wenten, M., Gilliland, F. D., Baumgartner, K. and Samet, J. M. (2002) Associations of weight, weight change, and body mass with breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women. *Ann Epidemiol* **12**: 435-434.

West, J. W., Numann, R., Murphy, B. J., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1991) A phosphorylation site in the Na+ channel required for modulation by protein kinase C. *Science* **254**: 866-868.

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(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10910-10914.

Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Birbe, R. C., Howell, A., Pavlides, S., Gandara, R., Pestell, R. G., Sotgia, F., Philp, N. J. and Lisanti, M. P. (2011) Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* **10**: 1772-1783.

Williams, A. C., Collard, T. J. and Paraskeva, C. (1999) An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* **18**: 3199-3204.

Willoughby, D., Masada, N., Crossthwaite, A. J., Ciruela, A. and Cooper, D. M. (2005) Localized Na+/H+ exchanger 1 expression protects Ca2+-regulated adenylyl cyclases from changes in intracellular pH. *J Biol Chem* **280**: 30864-30872.

Wittig, I. and Schagger, H. (2009) Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* **9**: 5214-5223.

Woelfle, U., Cloos, J., Sauter, G., Riethdorf, L., Janicke, F., van Diest, P., Brakenhoff, R. and Pantel, K. (2003) Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* **63**: 5679-5684.

Wolf, K. and Friedl, P. (2009) Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin Exp Metastasis* **26**: 289-298.

Wolpert, N., Warner, E., Seminsky, M. F., Futreal, A. and Narod, S. A. (2000) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in male breast cancer patients in Canada. *Clin Breast Cancer* **1**: 57-63; discussion 64-55.

Wong, P., Kleemann, H. W. and Tannock, I. F. (2002) Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *Br J Cancer* **87**: 238-245.

Wong, P., Lee, C. and Tannock, I. F. (2005) Reduction of intracellular pH as a strategy to enhance the pH-dependent cytotoxic effects of melphalan for human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **11**: 3553-3557.

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 Ther* **4**: 317-322.

Wu, D., Doods, H. and Stassen, J. M. (2006) Inhibition of human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration by sabiporide, a new specific NHE-1 inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* **48**: 34-40.

Wu, G., Ai, T., Kim, J. J., Mohapatra, B., Xi, Y., Li, Z., Abbasi, S., Purevjav, E., Samani, K., Ackerman, M. J., Qi, M., Moss, A. J., Shimizu, W., Towbin, J. A., Cheng, J. and Vatta, M. (2008a) alpha-1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**: 193-201.

Wu, K. L., Khan, S., Lakhe-Reddy, S., Wang, L., Jarad, G., Miller, R. T., Konieczkowski, M., Brown, A. M., Sedor, J. R. and Schelling, J. R. (2003) Renal tubular epithelial cell apoptosis is associated with caspase cleavage of the NHE1 Na+/H+ exchanger. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F829-839.

Wu, L., Yong, S. L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., Zhang, X., Obejero-Paz, C. A., Rho, H. J., Ke, T., Szafranski, P., Jones, S. W., Chen, Q. and Wang, Q. K. (2008b) Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav 1.5. *J Biol Chem* **283**: 6968-6978.

Wu, Y. C., Wu, W. K., Li, Y., Yu, L., Li, Z. J., Wong, C. C., Li, H. T., Sung, J. J. and Cho, C. H. (2009) Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **382**: 451-456.

Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G. D., Turley, H., Talks, K. L., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Harris, A. L. (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* **60**: 7075-7083.

Xu, L. and Fidler, I. J. (2000) Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**: 4610-4616.

Xu, L., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2002) Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J Biol Chem* **277**: 11368-11374.

Xu, S. Z., Zeng, F., Lei, M., Li, J., Gao, B., Xiong, C., Sivaprasadarao, A. and Beech, D. J. (2005) Generation of functional ion-channel tools by E3 targeting. *Nat Biotechnol* **23**: 1289-1293.

Xu, W. Q., Song, L. J., Liu, Q., Zhao, L., Zheng, L., Yan, Z. W. and Fu, G. H. (2009) Expression of anion exchanger 1 is associated with tumor progress in human gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 1323-1330.

Yamada, H., Yamazaki, S., Moriyama, N., Hara, C., Horita, S., Enomoto, Y., Kudo, A., Kawakami, H., Tanaka, Y., Fujita, T. and Seki, G. (2003) Localization of NBC-1 variants in human kidney and renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 1213-1218.

Yamagata, M. and Tannock, I. F. (1996) The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: in vitro and anti-tumour effects. *Br J Cancer* **73**: 1328-1334.

Yamagata, M., Hasuda, K., Stamato, T. and Tannock, I. F. (1998) The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* **77**: 1726-1731.

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.

Yan, W., Nehrke, K., Choi, J. and Barber, D. L. (2001) The Nck-interacting kinase (NIK) phosphorylates the Na+-H+ exchanger NHE1 and regulates NHE1 activation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **276**: 31349-31356.

Yang, J., Mani, S. A. and Weinberg, R. A. (2006) Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* **66**: 4549-4552.

Yang, J. and Weinberg, R. A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**: 818-829.

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 Res Treat*

Yang, N. and Horn, R. (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**: 213-218.

Yang, N., George, A. L., Jr. and Horn, R. (1996) Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* **16**: 113-122.

Yang, P., Kupershmidt, S. and Roden, D. M. (2004) Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res* **61**: 56-65.

Yang, X., Wang, D., Dong, W., Song, Z. and Dou, K. (2010) Over-expression of Na+/H+ exchanger 1 and its clinicopathologic significance in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* **27**: 1109-1113.

Yang, Y., Wu, P. P., Wu, J., Shen, W. W., Wu, Y. L., Fu, A. F., Zheng, L., Jin, X. L. and Fu, G. H. (2008) Expression of anion exchanger 2 in human gastric cancer. *Exp Oncol* **30**: 81-87.

Yarbrough, T. L., Lu, T., Lee, H. C. and Shibata, E. F. (2002) Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* **90**: 443-449.

Yasuda, S., Arii, S., Mori, A., Isobe, N., Yang, W., Oe, H., Fujimoto, A., Yonenaga, Y., Sakashita, H. and Imamura, M. (2004) Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* **40**: 117-123.

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.

Yilmaz, M. and Christofori, G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 15-33.

Yoon, J. Y., Ho, W. K., Kim, S. T. and Cho, H. (2009) Constitutive CaMKII activity regulates Na+ channel in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **47**: 475-484.

Yu, F. H. and Catterall, W. A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **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., Scheuer, T. and Curtis, R. (2003) Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* **23**: 7577-7585.

Yu, L. and Hales, C. A. (2011) Silencing of sodium-hydrogen exchanger 1 attenuates the proliferation, hypertrophy, and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via E2F1. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**: 923-930.

Yu, X. and Machesky, L. M. (2012) Cells assemble invadopodia-like structures and invade into matrigel in a matrix metalloprotease dependent manner in the circular invasion assay. *PLoS One* **7**: e30605.

Yuan, J., Narayanan, L., Rockwell, S. and Glazer, P. M. (2000) Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res* **60**: 4372-4376.

Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A. and Marchisio, P. C. (1988) The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J Bone Miner Res* **3**: 517-523.

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. *J Biol Chem* **286**: 33641-33651.

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. and Waxman, S. G. (2008) Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain. *Pain* **139**: 90-105.

Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2004) A gating hinge in Na+ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* **41**: 859-865.

Zhou, C. and Baltz, J. M. (2012) Janus kinase 2 mediates the acute response to a cell volume decrease in mouse preimplantation embryos by activating Na(+) /H(+) exchanger isoform 1. *J Cell Physiol*

Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A. L., Jr. and Murray, K. T. (2000) Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in Xenopus oocytes. *Circ Res* **87**: 33-38.

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. *Circ Res* **91**: 540-546.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. and MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K+ channel-Fab complex at 2.0 A resolution. *Nature* **414**: 43-48.

Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M., West, D. W., Wu-Williams, A. H., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal, J. F. and Hyer, M. B. (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1819-1827.

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.

Lucie BRISSON

Modulation de l'échangeur Na^+/H^+ de type 1 (NHE1) par le canal sodique dépendant du voltage $Na_V1.5$

Implication dans l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires humaines

Résumé

Les cellules cancéreuses mammaires invasives expriment des canaux sodiques $Na_V1.5$ dont l'activité semble être associée au développement métastatique. L'activité de ce canal dans les cellules MDA-MB-231 conduit à une acidification péricellulaire favorable à l'activité des cathepsines à cystéine B et S extracellulaires et à la dégradation de la matrice extracellulaire. Au cours de cette thèse, nous avons montré que l'échangeur NHE1 est le principal régulateur du pH des cellules MDA-MB-231 et que l'activité du canal $Na_V1.5$ augmente l'activité d'efflux de protons par NHE1 vraisemblablement par modulation allostérique. $Na_V1.5$ et NHE1 sont co-localisés dans des radeaux lipidiques et plus particulièrement dans les invadopodes des cellules MDA-MB-231. Les activités de NHE1 et $Na_V1.5$ stimulent l'activité protéolytique des invadopodes. Enfin, l'activité du canal $Na_V1.5$ semble moduler le cytosquelette et la morphologie des cellules cancéreuses MDA-MB-231 pour leur donner un phénotype invasif. En conclusion, $Na_V1.5$ augmente l'activité de NHE1 dans les invadopodes stimulant ainsi l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires.

Mots clés : canaux sodiques dépendants du voltage, échangeurs sodium-proton, invadopodes, invasivité des cellules cancéreuses

Résumé en anglais

Invasive breast cancer cells express $Na_V1.5$ sodium channels which activity seems to be associated with metastatic progression. The activity of the channel in MDA-MB-231 cells leads to a pericellular acidification favourable for the activity of extracellular cysteine cathepsins B and S and for extracellular matrix degradation. During this thesis, we have shown that NHE1 exchanger is the main pH regulator in MDA-MB-231 cells and that the activity of $Na_V1.5$ channels increases protons efflux activity of NHE1 possibly through allosteric modulation. $Na_V1.5$ and NHE1 are co-localised in lipid rafts and in invadopodia of MDA-MB-231 cells. The activity of NHE1 and $Na_V1.5$ promotes the proteolytic activity of invadopodia. Finally, the activity of $Na_V1.5$ channels seems to modulate cytoskeleton and morphology of MDA-MB-231 cancer cells to promote the acquisition of a proinvasive phenotype. In conclusion $Na_V1.5$ increases NHE1 activity in invadopodia to stimulate breast cancer cells invasiveness.

Keywords: voltage-gated sodium channel, sodium-proton exchangers, invadopodia, cancer cells invasiveness