UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE "Santé, Sciences, Technologies"

UNITE INSERM U921 "NUTRITION CROISSANCE ET CANCER"

THÈSE

présentée par :

Ludovic GILLET

soutenue le : **3 septembre 2010**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

IMPLICATION DES CANAUX SODIQUES DÉPENDANTS DU VOLTAGE DANS L'INVASIVITÉ DE CELLULES CANCÉREUSES MAMMAIRES ET RÉGULATION PAR L'ACIDE DOCOSAHEXAÈNOÏQUE

THÈSE dirigée par M. LE GUENNEC Jean-Yves, Professeur des Universités, Université Montpellier 2
et co-encadrée par M. BESSON Pierre, Maître de Conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme LAGADIC-GOSSMANN Dominique	Directeur de Recherche CNRS, Rennes
M. SORIANI Olivier	Maître de Conférences, HDR, Université de Nice

---

JURY :

M. BESSON Pierre	Maître de Conférences, Université de Tours
M. BOUGNOUX Philippe	Professeur des Universités, Université de Tours
M. KELLENBERGER Stephan	Maître d'Enseignement et de Recherche, Université de Lausanne
Mme. LAGADIC-GOSSMANN Dominique	Directeur de Recherche CNRS, Rennes
M. LE GUENNEC Jean-Yves	Professeur des Universités, Université Montpellier 2
M. ROGER Sébastien	Maître de Conférences, Université de Tours
M. SORIANI Olivier	Maître de Conférences, Université de Nice
M. VAN COPPENOLLE Fabien	Professeur des Universités, Université Lyon 1

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire "Nutrition, Croissance et Cancer",

Unité INSERM U921, Université François-Rabelais de Tours,

Dirigé par le Pr. Philippe Bougnoux.

Cette thèse a été financée par le Conseil Régional de la Région Centre pendant les trois premières années. La quatrième année de thèse a été effectuée dans le cadre d'un contrat d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche à temps partiel (A.T.E.R Doctorants).

Thèse dirigée par le Pr. Jean-Yves Le Guennec

et co-encadrée par le Dr. Pierre Besson.

Remerciements

Après ces quatre merveilleuses années passées au laboratoire (voire ces dix très belles années passées à l'université), je ne suis pas certain que de simples mots suffiront à vous dire merci comme vous le méritez…

Je tiens à remercier tout d'abord le Pr. Philippe BOUGNOUX. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci également pour toutes vos réflexions, analyses ainsi que pour les conseils que vous avez pu me prodiguer, que cela concerne la thèse ou bien l'après thèse…

Je voudrais remercier tout particulièrement Jean-Yves LE GUENNEC et Pierre BESSON pour leur excellent encadrement, mais aussi pour tout ce qu'ils m'ont apporté pendant ces quatre années de thèse.

Jean-Yves, avant même d'être mon directeur de thèse, tu as été mon professeur d'électrophysiologie, dès la licence. La qualité de tes cours ainsi que le professeur sortant un peu de l'ordinaire que tu étais m'ont beaucoup aidé dans le choix de la voie que je suis aujourd'hui. Merci d'être toujours à l'écoute des étudiants et de nous guider lorsque nous en avons besoin. Il est vrai qu'en licence je n'aurais jamais imaginé faire une thèse avec toi ; je te remercie de m'avoir donné cette chance. Merci pour tous tes conseils que ce soit avant ou pendant la thèse. Je me répète mais merci encore pour ton encadrement, merci pour ta confiance et surtout merci de m'avoir aidé à développer mon esprit critique. Merci également pour tous les bons moments passés avec toi pendant ces quelques (trop courtes) années de thèses. Merci de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès scientifiques, et par la même occasion de découvrir les restaurants Tex-mex du monde entier (en particulier celui de Genève…). Je te remercie également de m'avoir donné l'envie de renouer avec le monde des arts martiaux pendant ma thèse, et de m'avoir fait découvrir par ailleurs de nouveaux horizons musicaux (aaaah Higelin…). Enfin, même si tu as dû t'éloigner pendant ma dernière année de thèse, au final tu n'étais jamais très loin…

Pierre, merci à toi d'avoir été toujours présent pour répondre, quelle que soit l'heure de la journée ou de la soirée, aux moindres questions que je me posais. Merci de nous faire partager au quotidien tes innombrables connaissances et d'avoir à chaque fois la solution à nos problèmes. Ce fût une réelle chance et un très grand plaisir que de t'avoir comme encadrant de thèse. Tu es je pense la personne la plus cultivée que je connaisse, mais également la plus modeste… Merci de m'avoir transmis une certaine rigueur scientifique, mais aussi tous tes petits trucs et astuces utiles au quotidien… Je te remercie également pour tous les bons moments passés en ta compagnie que ce soit au labo, en congrès ou au cours des différentes soirées…

Je tiens également à remercier infiniment Sébastien ROGER. Si Jean-Yves et Pierre peuvent être considérés comme nos "Papas scientifiques", toi tu fus le "Grand frère", et un modèle pour notre génération de thésards. Je ne te remercierai jamais assez pour tous tes conseils, pour ta bonne humeur, ainsi que pour m'avoir associé à tes travaux et projets de recherche. Je n'oublierai pas ces trois années passées à tes côtés dans le bureau 3 qui n'ont été que pur bonheur (quoique je ne sois pas sûr que "pur" soit le mot qui convienne le mieux…), et marquées par de grands éclats… de rires. Seb, merci pour tout. Je te souhaite pour la suite une longue et belle carrière d'enseignant chercheur que tu mérites, mais aussi tout le bonheur possible avec ta petite famille.

Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury. Merci à Mme. Dominique LAGADIC-GOSSMANN et M. Olivier SORIANI qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail, malgré leurs nombreuses charges. Merci également à Messieurs Fabien VAN COPPENOLLE et Stephan KELLENBERGER d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateurs.

J'adresse mes plus grands remerciements à tous les membres du laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer. Merci à vous pour votre accueil, vos conseils, et tous les bons moments passés en votre compagnie. Merci à vous tous pour l'excellente ambiance de travail qui règne au sein de ce laboratoire et qui fait que chaque matin, quand parfois même il est difficile de se lever, on est heureux de venir au N2C.

Merci à notre super secrétaire Catherine LEROY dite "Cathy Cat". Merci pour ta gentillesse mais aussi pour tes super blagues internet, tes PowerPoint écolos, tes pétitions pour protéger et sauver le monde…

Merci à nos techniciennes de choc, présentes et passées : merci à Isabelle "Zaza" "T*t*ns d'acier" DOMINGO, Violetta GUERIN, Catherine GIRARDIN et Emeline MARAIS. Je remercie également Michelle PINAULT, notre ingénieur d'étude, pour son aide et ses conseils pour la biochimie des lipides.

Merci beaucoup à Christophe VANDIER pour tous ses conseils, que ce soit au niveau de la recherche ou de l'enseignement. Merci d'avoir été en quelque sorte mon tuteur pour cette année d'enseignement en tant qu'ATER. Merci à toi pour les nombreuses discussions scientifiques que l'on a pu avoir ensemble au laboratoire et les théories plus ou moins loufoques que l'on a pu élaborer au cours des différents congrès (et surtout la théorie du rhum arrangé… qui arrange tout…). Merci pour ton optimisme, pour tous les bons moments passés en ta compagnie et aussi pour tes super blagues… (si tu écrivais un recueil avec tu risquerais de mettre en faillite la marque Carambar…).

Je tiens également à remercier Jacques GORE, grand spécialiste du pH, et du mi bémol… et avec qui nos chemins n'ont cessé de se croiser depuis que je suis tout petit. Merci pour tes conseils et pour toutes les discussions scientifiques, musicales, et parfois philosophiques (surtout à Noël…), que l'on a pu avoir ensemble.

Je souhaite également remercier Stéphan CHEVALIER. Merci de nous faire profiter de ton expérience, mais aussi de tes grandes théories (avec une petite pensée pour tes moutons et pour ton arroseur automatique tsss tsss tsss tsss tss…). Merci pour tous tes conseils. Je te souhaite bon courage pour la tâche de porteur de projet du laboratoire qui t'a été confiée.

Et bien sûr, un grand MERCI à tous les étudiants et amis qui contribuent ou ont contribué à faire vivre ce laboratoire.

Merci d'abord aux anciens thésards: Aurélia, Marie, Sophie V, Aude et Tran. Merci à Marie et Aurélia pour votre accueil chaleureux et pour m'avoir guidé dans mes premiers mois de thèse. Merci à Marie d'avoir accouru pour nous consoler au moment où nous étions si tristes de voir Jean-Yves quitter le bureau 3 (et des léchouilles à Ben au passage…). Merci à Tran (eh mon ami !) pour tous les bons moments partagés et tous tes petits plats… Merci à Aude, ô toi qui fus ma co-thésarde. Si je pars en Angleterre j'espère que tu viendras me voir histoire de te changer un peu du soleil montpelliérain (en tout cas moi c'est promis je viendrai te voir).

Merci à mes compagnons de thèse : Alban, Romain, Mimsy, Sophie K, Fabio, Nawale (compagnon du dimanche après-midi), David Ninja-cobi, et aux petits derniers : Ramez (dit "Ramsès"), Joan (dit "Champion") et Lucie ("la petite").

Merci à Alban, un "grand chercheur", compagnon depuis le début de ma thèse. Merci pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ensemble, les éclats de rire (c'est vrai qu'à l'époque de Tran c'était quand même la fine équipe…), les moments d'émotions, les soirées de congrès à refaire le monde (mon ami, l'avenir est devant nous, il faut en profiter pour faire de grandes choses!), et tout le reste... N'oublions pas de remercier nos sponsors du midi et de certains soirs : Martine et Mario du p'tit Bota, nos restos chinois et japonais, et enfin un certain grand restaurant américain.

Merci à Romain pour tous les bons moments passés en ta compagnie, aussi bien au labo que dans les congrès et dans nos diverses soirées (tu fais une thèse sur quoi déjà… et y'a des gens que ça intéresse ???). Mes hommages à Mme Félix.

Lucie, nous t'avons connue toute timide quand tu es arrivée au laboratoire, mais en réalité tu as du "potentiel". Nous comptons sur toi pour prendre la relève. N'oublie pas de t'occuper comme il se doit du mur des thésards (d'ailleurs je crois qu'on y'a toujours pas accroché la photo d'une certaine Subaru…).

A nos anciens petits M2 qui démarrent déjà leur thèse : Justine, Lucie "Boulette", Virginie et Bilel, je vous souhaite à tous bon courage pour la grande aventure qui vous attend.

Merci également à Aurélie (même si je dois partir quelques temps en post doc à l'étranger je suis sûr que l'on finira quand même par se retrouver dans un festival, ou au moins autour d'une bière à la guinguette…), à Jean-François, à Karine et à Caro (et merci encore de ne pas m'avoir laissé dormir sous les ponts à Lyon…), à Aurore, Stéphane S, Marie Lise, Charly C, François L et François M et à tous les autres membres du N2C (aurais-je oublié quelqu'un… ?).

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer pendant ces années de thèse. Merci à Virginie JOULIN (IGR, Villejuif) et à Christine COLLIN (INSERM U966, Tours) pour leurs cours particuliers de biologie moléculaire. Merci à Gilles LALMANACH et Fabien LECAILLE (INSERM U618, Tours), grands spécialistes des cathepsines à cystéine. Merci également à Sarah CALAGHAN de l'Université de Leeds (UK) pour m'avoir initié au monde des microdomaines membranaires ainsi qu'au « full English breakfast ». Merci aussi pour tout le reste. J'espère sincèrement pouvoir travailler à nouveau avec toi… Je remercie également les doctorants, post-docs et techniciens avec lesquels j'ai passé de très bons moments en juillet 2009 au laboratoire d'Annmarie Surprenant à l'Université de Manchester. Merci tout particulièrement à Vince, Liam, Si, Gloria et Austen.

Je souhaite remercier tout particulièrement Denise POISSON, Dominique BABUTY et Jérôme THIREAU pour leur encadrement en stage de Master 1 et Master 2. Merci à vous pour m'avoir initié au monde de la recherche. Merci pour votre esprit d'équipe, votre gentillesse et pour toutes vos autres qualités qui m'ont en fin de compte motivé pour poursuivre en thèse, à une époque où j'avais encore quelques doutes au sujet de mon orientation.

Merci à tous les amis que j'ai pu rencontrer à l'université et qui m'ont soutenu pendant ces années de thèse et notamment aux bestiaux et aux babouins : Magaloch' (merci pour tes mails d'encouragement pendant la rédaction mais aussi pour le décompte des jours restants avant l'échéance…), Brice, Téva, Francis, Tania, Anne-So, Ham' et Emilie, Hélène, Anne-Flore, Catherine, Loïc et tous les autres. Merci à Wilfried. Merci également à mes amis de la fanfare médecine de Tours, la Vaginale, ainsi qu'aux anciens et nouveaux membres du bureau de l'Association des DOCtorants de Tours. Bravo à tous pour votre travail et votre engagement.

Merci aussi à Jérôme T, Diana, Jérôme B, Ben, Laura et ses collègues (les filles du troisième…), pour tous les bons moments passés avec vous en master et/ou en thèse.

Je tiens aussi à remercier Florent Pelletier et les élèves du club "Arts Martiaux de Touraine". Même si je n'ai pas été très assidu aux cours cette année, les heures passées au

dojo durant ces trois dernières années m'ont beaucoup apporté tant sur le plan physique que moral. Je n'ai qu'un seul regret, c'est d'avoir attendu tant d'années avant de vous retrouver.

Merci également à Vincent mon pote de toujours. Merci pour ton soutien et tes encouragements durant cette thèse et pour les quelques soirées parisiennes (avec Jean-Mat, Perrine & Cie), footing du dimanche matin et traditionnelle bière du dimanche soir de ces dernières années.

Merci enfin à ma famille. Merci à mes parents et à mon frère Yoann qui ont toujours été présents quand il le fallait. Merci pour votre soutien, merci de m'avoir toujours encouragé à suivre cette voie. Merci pour votre amour. Ma dernière pensée ira à ma grand-mère qui aurait été je pense très heureuse aujourd'hui ; elle qui souhaitait tellement que son petit fils soit "docteur"…

Résumé

Le projet de l'U921 "Nutrition, Croissance et Cancer" est de montrer et de comprendre comment certains nutriments de nature lipidique retardent l'apparition et l'évolution des maladies cancéreuses et augmentent l'efficacité de la réponse aux thérapeutiques. Les acides gras polyinsaturés de la série n-3 (AGPI n-3) sont des composants alimentaires dont les effets anti-cancéreux sont reconnus. Cependant leurs mécanismes d'action restent encore à définir. L'enrichissement membranaire en AGPI suite à une supplémentation ou à un régime alimentaire peut modifier l'activité de protéines transmembranaires telles que les canaux ioniques, par des effets directs entre les acides gras et des résidus d'acides aminés, par modification des propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires ou des voies de signalisation. Il a ainsi été décrit que les AGPI n-3 régulent l'activité de différents canaux ioniques cardiaques, dont les canaux sodiques.

L'intervention des canaux ioniques dans le processus cancéreux mammaire commence à être bien admise mais les mécanismes impliqués ne sont pas complètement élucidés. La lignée MDA-MB-231 est une lignée de cellules cancéreuses mammaires très invasive. Elle constitue un bon modèle d'étude *in vitro* des cancers métastatiques. Ces cellules expriment un canal sodique dépendant du voltage membranaire, $Na_V1.5$, qui est absent des cellules épithéliales normales ou cancéreuses faiblement métastatiques. Ce type de canal, qui est normalement une caractéristique des cellules excitables, semble réguler l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires qui l'expriment. Il a été proposé que l'expression de ce canal puisse servir de marqueur pronostique de métastases dans le cancer du sein. Au cours de cette thèse nous avons pu identifier les protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dont l'activité pourrait être régulée par $Na_V1.5$: les cathepsines à cystéine B et S. Il semblerait que ces cathepsines ne soient pas régulées directement au niveau transcriptionnel, traductionnel ou de la sécrétion, mais plutôt au niveau de leur activité par l'acidification du pH périmembranaire (pHm) suite au fonctionnement du $Na_V1.5$. Une telle acidification potentialise l'activité des cathepsines. Les acteurs impliqués dans la régulation du pH cellulaire, et dont l'activité pourrait être modulée par $Na_V1.5$, sont encore à déterminer. Nos premiers résultats d'analyse en western blot, après séparation sur gradient de densité, de différentes zones membranaires des cellules MDA-MB-231, suggèrent cependant que $Na_V1.5$ et l'échangeur sodium-proton NHE1 pourraient être co-localisés dans des microdomaines membranaires (les cavéoles) au niveau desquels les cathepsines peuvent être sécrétées.

Le DHA (acide docosahexaènoïque, 22:6n-3) est un AGPI n-3 qui possède des propriétés anti-tumorales, mais dont on ne connaît pas précisément les mécanismes d'action. Nous avons alors étudié la régulation du $Na_V1.5$ et de l'invasivité cellulaire par le DHA. Nos expériences montrent que la culture de cellules MDA-MB-231 pendant plusieurs jours avec du milieu supplémenté par une faible concentration de DHA provoque une réduction de l'invasivité ; l'invasion résiduelle de la matrice extracellulaire n'étant quasiment plus sensible à la TTX. Par ailleurs cette réduction d'invasion n'est pas observée sur les cellules MDA-MB-468, très invasives mais n'exprimant pas de Na_V. Ces résultats suggèrent qu'une faible concentration de DHA pourrait modifier l'activité du $Na_V1.5$. Des expériences de PCR quantitative et de western blot indiquent qu'il n'y a pas de modification tant transcriptionnelle que traductionnelle du $Na_V1.5$, alors qu'une diminution d'activité et une modification de la disponibilité des canaux est observée en patch-clamp. Il peut donc y avoir une régulation spécifique de l'activité de $Na_V1.5$ qui fait intervenir la composition en acides gras des phospholipides environnants. L'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires ne semble pas modifier la localisation du $Na_V1.5$ dans les cavéoles. Cette modification de la composition lipidique pourrait donc avoir soit un effet direct sur l'activité des canaux $Na_V1.5$ qui y sont localisés, soit un effet indirect, par la modulation de l'action de protéines régulatrices de $Na_V1.5$. Nous proposons donc à travers cette étude une nouvelle voie par laquelle les AGPI n-3 pourraient exercer leur action inhibitrice sur le développement des tumeurs et des métastases.

Mots-clés : cancer du sein, canaux sodiques dépendants du voltage, invasivité, cathepsines à cystéine, acides gras polyinsaturés n-3, microdomaines membranaires.

Résumé en anglais

Voltage-gated sodium channels (Na_V) are expressed in highly metastatic cancer cells derived from epithelial tissues. In the highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-231, we showed that the abnormal expression of $Na_V1.5$ was responsible for a sustained inward sodium current at the steady-state membrane voltage. These channels do not regulate cell multiplication but promote the invasion of the extracellular matrix. We found that $Na_V1.5$ activity leads to a perimembrane acidification favourable for the pH-dependent proteolytic activity of cysteine cathepsins B and S, which play a predominant role in cell invasiveness. Colocalisation of Na_V and pH regulators in membrane raft domains could promote this effect. Since n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) has been reported to reduce the aggressiveness of some breast cancers, and to be a modulator of ion channels, we chose to study its role on cell invasiveness and Na_V activity. Our work suggests that a chronic intake of DHA reduces MDA-MB-231 cells invasiveness by decreasing Na_V activity. This could be a new mechanism for the metastasis preventing effect of n-3 PUFA.

Keywords: breast cancer, voltage-gated sodium channels, invasiveness, cysteine cathepsins, n-3 polyunsaturated fatty acids, membrane microdomains.

Table des matières

Remerciements 5
Résumé 11
Résumé en anglais 13
Table des matières 15
Liste des publications 18
Liste des tableaux 19
Liste des figures 20
Liste des abréviations 23
Introduction 25
Revue bibliographique 29
I. Le cancer du sein 31
A. La glande mammaire 31
1. Organisation et histologie 32
2. Développement 32
B. Epidémiologie du cancer du sein 34
1. Incidence et mortalité du cancer du sein 34
2. Les facteurs de risque 35
C. Biologie du cancer du sein 37
1. Les étapes de la cancérogénèse 38
2. Le développement de la tumeur : rôle du micro-environnement tumoral 40
3. La dissémination des cellules cancéreuses et la formation de métastases 42
II. Canaux ioniques et cancer 46
A. Canaux sodiques dépendants du voltage 49
1. Structure et propriétés 50
2. Pharmacologie et régulation 63
B. Canaux sodiques voltage-dépendants et cancer 76
III. Protéases, cancer et microenvironement tumoral 101
A. Cathepsines à cystéine et cancer 102
B. pH extracellulaire et digestion de la MEC 106
IV. Acides gras et cancer 109
A. Acides gras : généralités 109
1. Structure et nomenclature 109

2. Propriétés 112
B. AGPI n-3 et cancer du sein 115
1. Données épidémiologiques et données expérimentales chez l'animal 115
2. Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire 117
3. Acides gras, microdomaines membranaires et canaux ioniques 120
C. Effets des AGPI n-3 dans le cancer et les maladies cardiovasculaires : implication des canaux sodiques voltage-dépendants 125
Matériel et méthodes 131
I. Etude des lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses 133
A. Culture cellulaire 133
1. Cellules utilisées 133
2. Conditions de culture, solutions et supports utilisés en culture cellulaire 133
3. Protocoles utilisés en culture cellulaire 138
B. Evaluation de la prolifération cellulaire : test MTT 140
1. Principe 140
2. Méthode 141
C. Evaluation de la migration et de l'invasion in vitro 142
II. Enregistrements des courants ioniques : la technique de patch clamp 145
A. Les différentes configurations du patch clamp 145
B. Dispositif expérimental 148
C. Protocoles expérimentaux 152
III. Techniques de biologie moléculaire 154
A. Etude de la transcription des gènes par RT-PCR 154
1. Extraction des ARN 154
2. Transcription inverse 155
3. Réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction) 156
B. Quantification des ARN : PCR quantitative en temps réel 159
1. Principe 159
2. Méthode 161
C. Etude des protéines par western-blot 163
1. Principe 163
2. Méthode 163
D. Transfection cellulaire transitoire par ARN interférents (siRNA) 169
1. Principe 169

2. Méthode 169
IV. Etude de l'activité des cathepsines à cystéine 170
V. Mesure du pH cellulaire par microspectrofluorimétrie 173
A. Mesure du pH intracellulaire 173
B. Mesure du pH périmembranaire 175
VI. Isolement des cavéoles 176
A. Principe 176
B. Méthode 176
1. Préparation des lysats cellulaires 176
2. Ultracentrifugation sur gradient de saccharose 177
VII. Analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires 179
A. Principe 179
B. Méthode 179
VIII. Analyse des isoformes de PKC 182
Résultats et discussion 185
I. Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité et la croissance de colonies de cellules cancéreuses : régulation des cathepsines à cystéine 187
A. Introduction 187
B. Article 188
C. Résumé 205
D. Discussion 205
II. Régulation des canaux sodiques voltage-dépendants et de l'invasivité cellulaire par l'acide docosahexaènoïque 213
A. Introduction 213
B. Résultats 216
C. Discussion 225
Conclusions générales et perspectives 233
Publications non intégrées à la thèse 247
Bibliographie 283

Liste des publications

Publications intégrées à la thèse :

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY. 2009. Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*. 284(13):8680-91.

Gillet L, Roger S, Bougnoux P, Le Guennec JY, Besson P. 2010. Beneficial effects of omega-3 long-chain fatty acids in breast cancer and cardiovascular diseases: voltage-gated sodium channels as a common feature? *Biochimie*. Sous presse.

Gillet L, Roger S, Potier M, Brisson L, Vandier C, Besson P, Le Guennec JY. 2010. Voltage-Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy? *Frontiers in Medicinal Chemistry*. Sous presse.

Autres publications :

Tran TA, Gillet L, Roger S, Besson P, White E, Le Guennec JY. 2009. Non-anti-mitotic concentrations of taxol reduce breast cancer cell invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):304-8.

Roger S, Gillet L, Baroja-Mazo A, Surprenant A, Pelegrin P. 2010. A C-terminal calmodulin binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J Biol Chem*. 285(23):17514-24.

Depla M, Uzbekov R, Hourioux C, Blanchard E, Le Gouge A, Gillet L, Roingeard P. 2010. Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci*. Sous presse.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes isoformes des sous-unités alpha de canaux sodiques chez l'humain. 53
Tableau 2 : Sites de liaison des toxines et insecticides (en italique) sur les canaux sodiques voltage-dépendants. 64
Tableau 3 : Expression tissulaire et fonctions des cathepsines à cystéine humaines. 105
Tableau 4 : Nomenclature systématique et commune des principaux acides gras 111
Tableau 5 : Composition du D-PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} 135
Tableau 6 : Composition de la solution de Trypsine – EDTA 136
Tableau 7 : Composition du PSS 151
Tableau 8 : Composition du MIP. 151
Tableau 9 : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés en PCR et Q-PCR et taille attendue des fragments amplifiés. 162
Tableau 10 : Composition du tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS utilisé pour la migration (pH 8,3). 165
Tableau 11 : Composition du tampon de transfert (pH 8,3) 165
Tableau 12 : Composition du TTBS (pH 7,3) 166
Tableau 13 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour l'étude en western blot des protéines d'intérêt. 167
Tableau 14 : Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés en western blot. 168
Tableau 15 : Récapitulatif des différents substrats fluorigéniques utilisés pour l'étude des différentes cathepsines. 171
Tableau 16 : Récapitulatif des différents inhibiteurs de cathepsines à cystéine utilisés. 172
Tableau 17: Composition des solutions de saccharose 177
Tableau 18 : Composition du tampon d'extraction des protéines 182

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale de sein (a) et histologie de la glande mammaire (b).32
Figure 2 : Incidence annuelle des différents cancers chez les sujets féminins. 34
Figure 3 : Caractéristiques principales des cellules cancéreuses. 37
Figure 4 : Processus multi-étapes de cancérogenèse. 40
Figure 5 : Micro-environnement de la tumeur primaire. 42
Figure 6 : Les principales étapes de la formation de métastases. 43
Figure 7 : Expression de différents canaux ioniques au cours de la progression tumorale. 47
Figure 8 : Dendrogramme représentant les canaux ioniques classés dans la superfamille des canaux voltage-dépendants, selon la nomenclature IUPHAR.. 49
Figure 9 : Structure des canaux sodiques voltage-dépendants. 50
Figure 10 : Représentation 3D du Na_V. 55
Figure 11 : Activation dépendante du voltage par mouvement sortant des détecteurs de voltage S4. 57
Figure 12 : Modèles moléculaires du mouvement du détecteur de voltage S4.. 57
Figure 13 : Mécanismes d'inactivation des canaux sodiques. 59
Figure 14 : Structure des canaux sodiques voltage-dépendants. 60
Figure 15 : Régulation de l'expression et du trafic intracellulaire du $Na_V1.5$ dans les cellules cardiaques. 68
Figure 16 : Structure des domaines des différentes isoformes de PKC. 71
Figure 17 : Schéma représentant les différentes sous-unités du Na_V ainsi que les sites de liaison des protéines régulatrices. 75
Figure 18 : Structure tridimensionnelle des cathepsines : exemple de la cathepsine L. 103
Figure 19 : Exemple d'acides gras saturé, mono-insaturé et polyinsaturé. 110
Figure 20 : Nomenclature des acides gras, exemple de l'acide α-linolénique. 111
Figure 21 : Transport des lipides par les lipoprotéines. 113
Figure 22 : Biosynthèse des acides gras chez les mammifères 114
Figure 23 : Schéma récapitulatif des différents mécanismes pouvant être affectés par les AGPI n-3 119
Figure 24 : Représentation schématique des radeaux lipidiques ("lipid rafts") dans la membrane plasmique. 121
Figure 25 : Incorporation des AGPI n-3 dans les microdomaines membranaires. 123

Figure 26 : Cellules MDA-MB-231 colorées à l'hématoxyline sur la face inférieure d'un insert de migration..... 143
Figure 27 : Représentation schématique des tests de migration et d'invasion *in vitro*. 144
Figure 28 : Les différentes configurations du patch clamp. 146
Figure 29 : Technique de patch clamp en configuration whole cell. 148
Figure 30 : Schéma de l'installation de patch-clamp. 150
Figure 31 : Schéma de la transcription inverse d'ARNm en ADNc. 155
Figure 32 : Les trois étapes d'un cycle de PCR. 157
Figure 33 : Courbes de fluorescence détectée au cours de l'amplification. 160
Figure 34 : Isolement des radeaux lipidiques ("lipid rafts") sur gradient de saccharose. 178
Figure 35 : Exemple de chromatogramme de la composition en acides gras des phospholipides membranaires de cellules MDA-MB-231. 181
Figure 36 : Effet de la déplétion en SVF du milieu de culture sur le courant sodique. 207
Figure 37 : Effet de l'augmentation de la concentration de SVF dans le milieu de culture sur le courant sodique. 207
Figure 38 : Analyse en western blot de la localisation du Na_V et du NHE1 dans les différentes fractions membranaires. 210
Figure 39 : Effet des acides gras insaturés sur la prolifération des cellules MDA-MB-231. 216
Figure 40 : Effet des acides gras insaturés et de la TTX sur la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231. 217
Figure 41 : Effet de l'application aiguë des solutions d'acides gras et de la TTX, sur les courants sodiques. 218
Figure 42 : Effet de 5 jours de supplémentation du milieu de culture en OA ou en DHA sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231. 219
Figure 43 : Effet de différentes concentrations d'acides gras sur la relation courant-voltage. 220
Figure 44 : Effet de la supplémentation du milieu de culture avec 1 µM d'OA ou de DHA sur l'activation (à gauche) et la disponibilité (à droite) des canaux sodiques des cellules MDA-MB-231. 221
Figure 45 : Effet du traitement par les acides gras (OA et DHA) sur la transcription et l'expression protéique du Na_V. 222
Figure 46 : Incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires des cellules MDA-MB-231 après 5 jours de supplémentation du milieu de culture avec 1 µM de DHA. 224
Figure 47 : Effet du DHA sur la localisation du Na_V. 225

Figure 48 : Schéma récapitulatif des mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation de l'invasivité dépendante du $Na_V1.5$. 238

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AG : Acide gras

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

AKAP : A-Kinase Anchoring Protein

ALA : Acide alpha linolénique

AMPc : Adénosine monophosphate 3', 5' cyclique

ARN : Acide ribonucléique

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

CaM : Calmoduline

CAMKII : Kinase Ca^{2+}-calmoduline dépendante II

CHO : Chinese hamster ovary, cellules d'ovaires de hamster

CNG : Cyclic nucleotide-gated channels, canaux activés par des nucléotides cycliques

Ct : Threshold cycle, cycle seuil

DAG : Diacylglycérol

DHA : Acide docosahexaènoïque

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

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

EGF : Epidermal Growth Factor

EPA : Acide eicosapentaènoïque

HCN : Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated

Ig : Immunoglobuline

kDa : kilo Dalton

K_V : Canaux potassiques activés par le voltage

MIP : Milieu intrapipette

MMP : Matrix metalloproteases, métallprotéases de la matrice extracellulaire

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

Na_V : Canaux sodiques dépendants du voltage

NHE : Echangeur sodium-proton

OA : Acide oléique

PCR : Polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne

pHi : pH intracellulaire

pHm : pH périmembranaire

PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc

PLC : Phospholipase C

PPAR : Peroxysome Proliferator Activated-Receptor

PSS : Physiological Saline Solution

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SVF : Sérum de veau foetal

TRP : Transient Receptor Potential

TTX : Tétrodotoxine

VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor

Introduction

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde. Chaque année, plus de 1 million de cas sont diagnostiqués et plus de 400 000 patientes en meurent. Il représente à ce titre un problème majeur de santé publique. Lorsqu'un cancer est détecté à un stade précoce, c'est-à-dire avant qu'il n'ait disséminé, le pronostic de traitement est d'une manière générale relativement bon. En revanche s'il est détecté après l'apparition de métastases, les traitements ont beaucoup moins de succès. Il semble donc indispensable de pouvoir améliorer la compréhension des mécanismes conduisant à la formation de métastases afin d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour le développement de traitements en remplacement ou complémentaires aux traitements actuels. L'étude de l'implication des canaux ioniques dans les différentes étapes du processus oncogénique figure parmi les nouveaux champs d'investigation qui se sont développés au cours de la dernière décennie. Les canaux ioniques, qui sont des protéines transmembranaires impliquées dans diverses fonctions cellulaires, aussi bien dans les cellules électriquement excitables que dans les cellules non excitables, ont été décrits comme intervenant dans certaines propriétés des cellules cancéreuses et en particulier dans la prolifération cellulaire, la croissance tumorale et les mécanismes de migration et d'invasion, qui sont impliqués dans l'apparition des métastases. Ils représentent ainsi des cibles potentielles de traitement et commencent à susciter l'intérêt de l'industrie pharmaceutique, certains travaux récents ayant franchi l'étape pré-clinique. Parmi les canaux ioniques anormalement exprimés dans les cancers épithéliaux, les canaux sodiques voltage-dépendants (Na_V) sont souvent associés à un stade fortement invasif du cancer. Les travaux menés ces dernières années au laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer (Université - INSERM U921) ont permis de mettre en évidence l'implication de l'isoforme cardiaque $Na_V1.5$ dans l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires, c'est-à-dire dans leur capacité à dégrader les tissus environnants afin de pouvoir migrer. Des études menées par une équipe londonienne (M. Djamgoz - Imperial College, UK) ont confirmé que ce canal était retrouvé dans des biopsies de cancer du sein métastasant au niveau des ganglions lymphatiques. Dès lors est apparue la nécessité de comprendre par quels mécanismes ce canal pouvait être impliqué dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires. Le premier objectif de cette thèse a donc consisté à identifier les acteurs impliqués dans la capacité des cellules cancéreuses mammaires à dégrader la matrice extracellulaire et à comprendre les mécanismes par lesquels leur activité pouvait être régulée par les canaux Na_V.

Si les facteurs génétiques semblent intervenir dans près de 10 % des cas de cancer du sein recensés dans les pays développés, il est admis que les facteurs environnementaux

peuvent aussi jouer un rôle dans l'étiologie du cancer du sein. L'étude de ces facteurs de risques environnementaux, notamment de l'alimentation, présente un grand intérêt en terme de prévention puisque ces facteurs sont modifiables. Ainsi, l'alimentation apporte une large variété de composants susceptibles d'influencer le développement du cancer du sein. Parmi ces constituants, les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3 d'origine marine ont été identifiés comme des agents potentiellement protecteurs. Le projet du laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer, qui s'articule autour de volets cliniques, pré-cliniques et fondamentaux est d'étudier le rôle des nutriments d'origine lipidique dans l'augmentation de l'efficacité des traitements anticancéreux, la prévention de la récidive métastatique et la tolérance au traitement. La survie des patientes traitées pour un cancer du sein étant corrélée au développement de métastases, un des volets fondamentaux de l'équipe consiste en l'étude de la modulation par différents acides gras des acteurs moléculaires du développement métastatique que sont les canaux ioniques. En plus de leur effet protecteur potentiel sur le cancer du sein, les AGPI oméga-3 comme l'acide docosahexaènoïque (DHA) ont aussi été décrits pour leurs effets cardioprotecteurs et plus particulièrement anti-arythmiques. Plusieurs études ont alors montré que cet effet pourrait passer par la régulation des canaux sodiques cardiaques. Ainsi le deuxième objectif de cette thèse a consisté, en se basant en partie sur les données de la littérature dans le domaine cardio-vasculaire, à étudier l'effet du DHA sur l'activité des canaux $Na_V1.5$ des cellules cancéreuses et sur l'invasivité cellulaire, et à déterminer les mécanismes pouvant être impliqués dans cette régulation.

La réalisation d'une thèse dans un laboratoire de recherche offre à l'étudiant l'opportunité d'apprendre ou de développer de nouvelles techniques. Ces techniques une fois maitrisées peuvent être transposées à différents champs de recherche et peuvent permettre ainsi d'établir des collaborations avec d'autres laboratoires, et sur des thématiques différentes. Ainsi l'acquisition au cours de ma thèse de différentes techniques de biologie cellulaire, d'électrophysiologie et de biochimie des membranes m'a permis de travailler sur des sujets autres que mon sujet d'origine. Les publications qui ont découlé de ces diverses collaborations ont été intégrées à la fin du manuscrit.

Première partie

Revue bibliographique

I. Le cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie aux origines multifactorielles faisant intervenir des facteurs héréditaires, hormonaux et environnementaux. Malgré une meilleure connaissance cellulaire et moléculaire du processus d'oncogenèse et de dissémination métastatique, la connaissance de l'histoire intrinsèque du cancer du sein a peu évolué depuis le concept radical d'Halsted (le cancer évoluant progressivement de la tumeur vers les ganglions puis les métastases, la mastectomie radicale permettrait de contrôler le cancer et donc d'améliorer la survie), et ce n'est qu'en 1980 que le concept de maladie systémique s'est imposé (le traitement local est insuffisant et devrait toujours être associé à un traitement général). A quel moment le cancer du sein passe-t-il de la maladie locale à la maladie systémique ? Quels facteurs et mécanismes en sont responsables ? Le propre du cancer du sein est son hétérogénéité, qui concerne la diversité des cellules au sein même de la tumeur primitive, entre les différents sites de la maladie et entre les individus. Cette hétérogénéité explique la grande diversité de présentation et d'évolution des cancers du sein. Il ne parait pas raisonnable de considérer le cancer du sein comme une maladie qui progresse d'un stade à un autre (théorie de Halsted) ni comme une maladie purement systémique en négligeant le traitement local.

L'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse semble donc indispensable, afin de mieux prévenir, diagnostiquer et traiter le cancer du sein.

A. La glande mammaire

La glande mammaire représente l'essentiel du volume du sein. C'est un organe entièrement visible et palpable, d'une très grande importance psychologique, affective et sexuelle, sans oublier son rôle vital dans le maintien de l'espèce. Elle se caractérise par une très grande variabilité en consistance, en volume et en forme en fonction de chaque personne et en fonction du temps chez la même personne. Cette glande exocrine se développe plus particulièrement chez la femme lors de la puberté, la grossesse, et régresse à la ménopause pour ne garder qu'une ébauche d'organisation. Chez l'homme, la glande mammaire dont le développement est arrêté à un stade pré-pubertaire, est réduite à un petit amas glandulaire et reste susceptible de présenter les mêmes lésions pathologiques que chez la femme.

1. Organisation et histologie

Le sein se compose de la glande mammaire entourée par du tissu conjonctif et du tissu adipeux. Le tissu conjonctif est constitué de fibroblastes qui élaborent la matrice extracellulaire et des ligaments de soutien (ligaments de Cooper) qui assurent l'attachement du sein au muscle pectoral. On y trouve aussi d'abondants vaisseaux sanguins ainsi que des canaux lymphatiques reliés aux ganglions lymphatiques. Le tissu fibro-adipeux représente la majeure partie du sein. La glande mammaire adulte comporte une vingtaine de lobes mammaires, chacun drainé par un canal galactophore de premier ordre qui débouche dans le mamelon. Chaque lobe est constitué de nombreux lobules et chaque lobule est formé d'acini mammaires, encore appelés structures tubulo-alvéolaires et correspondant à la partie sécrétrice de la glande. L'acinus est une cavité glandulaire constituée d'une couche interne d'épithélium sécrétoire et une couche externe de cellules myoépithéliales (tissu musculaire lisse capable d'éjecter le lait en réponse au stimulus de succion). Un réseau complexe de canaux galactophores assure la collecte du lait **(Figure 1)**.

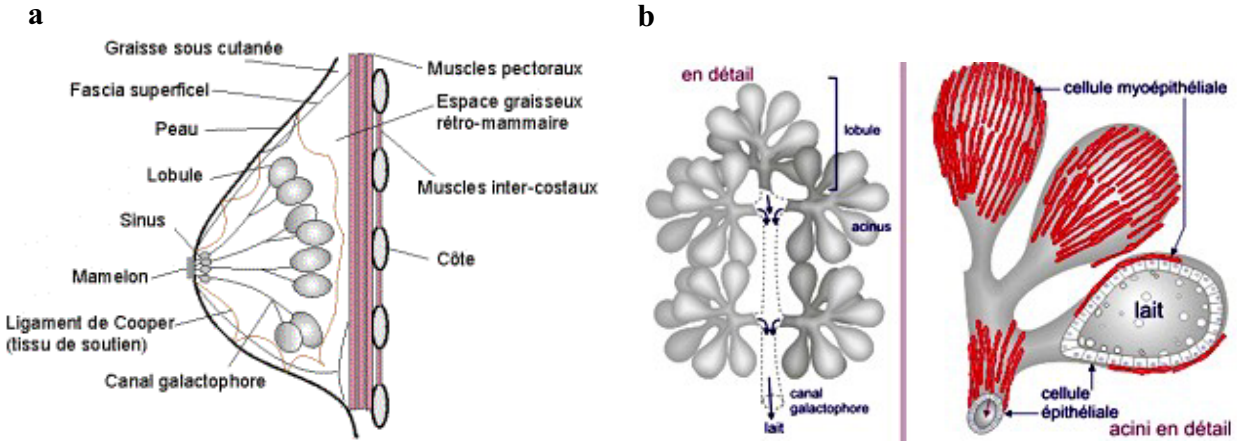


Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale de sein (a) et histologie de la glande mammaire (b).

a. source http://acces.inrp.fr/acces/equipes/santeepi/travaux/cancersein/glandemammaire/
b. source http://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN1images.php

2. Développement

Le développement de la glande mammaire est étroitement contrôlé par des hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestérone, corticoïdes) et des hormones peptidiques (prolactine, hormone de croissance, insuline) agissant en synergie avec le microenvironnement conjonctif des acini (facteurs de croissance locaux). Ces divers facteurs et hormones induisent et

contrôlent les changements de la glande mammaire durant la puberté, le cycle menstruel, la gestation et la lactation.

Au cours de la vie fœtale, et plus particulièrement lors du troisième trimestre de la grossesse, la mère produit des œstrogènes et de la progestérone qui provoquent chez le fœtus une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire, la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance, la glande reste dans cet état rudimentaire jusqu'à la puberté où les premières modifications ovariennes apparaissent, avec la mise en place des cycles menstruels. La glande mammaire est alors soumise à une alternance d'expositions aux œstrogènes ($1^{ère}$ moitié du cycle) et à la progestérone ($2^{ème}$ moitié du cycle). Durant la phase folliculaire, la production d'œstrogènes est associée à une prolifération de l'épithélium canalaire. Pendant la seconde moitié du cycle, la phase lutéale, l'augmentation de la progestérone provoque la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires. On observe une élongation des canaux existants, ce qui contribue à la formation de lobules de type 1, qui constituent la structure la plus rudimentaire de la glande. Avec la maturation sexuelle, les lobules évoluent vers des lobules de type 2, caractérisés par une augmentation du nombre d'alvéoles. En l'absence de grossesse, la glande reste dans cet état. Au cours de la grossesse, sous l'influence des œstrogènes, de la progestérone et de facteurs de croissance, les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent. On parle alors de lobules de type 3. En fin de grossesse et tout au long de la lactation, les lobules évoluent encore jusqu'aux lobules de type 4. En effet, les alvéoles ont pour rôle de produire du lait, qui sera acheminé jusqu'au mamelon par les canaux galactophores. Lors du sevrage, les alvéoles régressent et la glande revient à son état initial (lobule 2). Lors de la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire, les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent à régresser avec l'âge (lobule de type 1).

Ainsi, sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance, la glande mammaire est en évolution permanente et représente une cible privilégiée pour les transformations malignes.

B. Epidémiologie du cancer du sein

1. Incidence et mortalité du cancer du sein

Le cancer du sein, par sa fréquence, représente un problème de santé publique. Parmi tous les cancers diagnostiqués chaque année dans le monde, un sur dix est un cancer du sein chez la femme. Plus de 1,1 million de cas sont diagnostiqués dans le monde entier et plus de 410 000 patientes en meurent (Ferlay *et al.*, 2010). C'est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde (**Figure 2**), dans les pays industrialisés comme dans ceux en voie de développement, bien qu'il existe une grande variabilité géographique de l'incidence. En effet, dans les pays industrialisés, l'incidence est cinq fois plus élevée que dans les pays en voie de développement. En Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord elle atteint environ 100 pour 100 000 femmes et par an alors qu'elle est inférieure à 30 pour 100 000 en Afrique et en Asie (Parkin *et al.*, 2005).

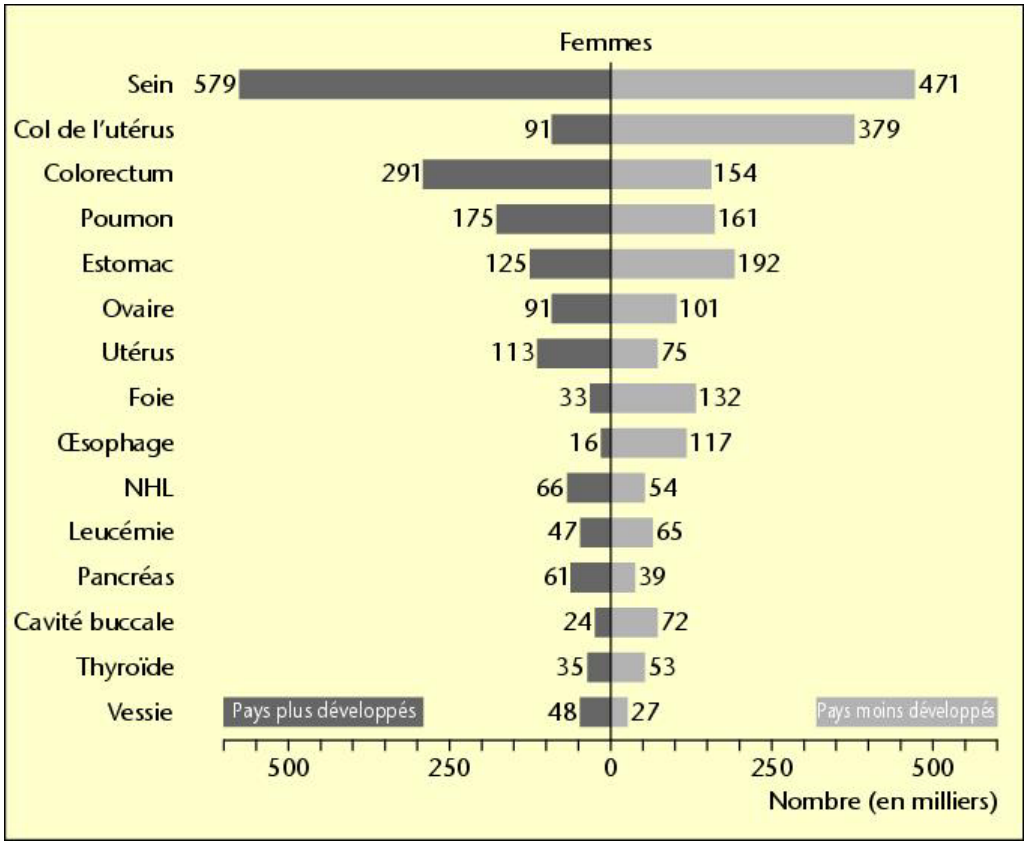


Figure 2 : Incidence annuelle des différents cancers chez les sujets féminins (tiré de **Riboli, 2004**).

NHL : lymphome non hodgkinien.

Parmi les pays européens, la France a une incidence de cancer du sein qui est élevée, et qui augmente régulièrement (de l'ordre de + 2,42 % par an entre 1978 et 2000). Le taux d'incidence est de 88,9 pour 100 000 femmes et par an (Remontet *et al.*, 2003). On estime en effet qu'entre 40 000 et 50 000 femmes sont atteintes chaque année en France (Esteve, 2007) et que plus de 11 000 en meurent, ce qui fait du cancer du sein la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Les taux de mortalité par cancer du sein augmentent avec l'âge : 10/100 000 femmes entre 35 et 40 ans, 80/100 000 vers 65 ans, 102/100 000 entre 70 et 74 ans et 245 pour 100 000 après 85 ans. L'étude EUROCARE a mis en évidence en France une survie à 5 ans de 82 %, ce qui la place au troisième rang en Europe. La différence de survie entre les différents pays est directement liée au stade lors du diagnostic (Coleman *et al.*, 2003; Sant *et al.*, 2003). L'absence d'aggravation de la mortalité par cancer du sein, malgré une incidence qui ne cesse de croître, est très certainement liée aux politiques de dépistage précoce de cette affection et aux moyens thérapeutiques.

Les études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence des facteurs ayant un rôle majeur dans l'étiologie du cancer du sein : les facteurs environnementaux. Contrairement aux facteurs génétiques, ces facteurs ouvrent un champ d'investigation prometteur puisqu'ils sont caractéristiques de notre mode de vie et peuvent être modifiés. Ainsi, la thématique principale du Laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer consiste à étudier les facteurs nutritionnels qui interviennent dans la prévention de l'apparition des cancers du sein et de leur récidive, et dans l'amélioration de leurs traitements, l'accent étant porté en particulier sur les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille n-3 et les éther-lipides.

2. Les facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque peuvent avoir une influence sur la venue d'un cancer du sein :

* Les antécédents familiaux

Il est démontré qu'un antécédent familial matri- ou patri-linéaire de cancer du sein augmente le risque ultérieur de cancer du sein. La fréquence des formes familiales de cancer du sein et leurs apparitions chez des patientes jeunes conduisent à évoquer le caractère héréditaire de ce cancer. Ainsi, 5 à 10 % des cancers du sein sont probablement d'origine familiale (Lynch *et al.*, 1988; Ottman *et al.*, 1983). L'association entre les gènes BRCA (BReast CAncer) et le risque de survenue d'un cancer familial précoce du sein a été décrite pour la première fois en 1992 (Hall *et al.*, 1992). En effet, la mutation des gènes BRCA1 et BRCA2 semble intervenir dans près de 10 % des cas de cancers du sein et de l'ovaire (McPherson *et al.*, 2000). Une

mutation du gène BRCA1 est associée au cancer du sein et de l'ovaire, avec respectivement 65 % et 40 % de risque de développer un cancer jusqu'à l'âge de 70 ans, tandis qu'une mutation de BRCA2 est plutôt associée au cancer du sein, le risque étant de 45% pour le cancer du sein et de 11% pour le cancer de l'ovaire (Antoniou *et al.*, 2003).

* Les facteurs hormonaux

D'une manière générale, l'exposition longue aux hormones sexuelles augmente le risque d'apparition du cancer du sein. Les hormones endogènes sont largement impliquées dans le développement de la glande mammaire et jouent de ce fait un rôle important dans le risque de cancer du sein. Ainsi, l'âge précoce lors des premières menstruations, la ménopause tardive et l'absence de grossesse menée à terme sont associés à un risque accru de cancer du sein (Chajes *et al.*, 2008; Clavel-Chapelon, 2002). A l'inverse, la maternité précoce, la multiparité et l'allaitement réduisent ce risque. L'utilisation d'hormones exogènes, incluant la contraception orale et les traitements hormonaux prescrits au moment de la ménopause augmentent également le risque de cancer du sein.

* L'alimentation

Plusieurs études ont établi des disparités géographiques dans l'incidence du cancer du sein, et certaines études concernant des populations migrantes ont montré le rôle important des facteurs environnementaux comme l'alimentation. Il a été montré en particulier que lorsque les japonaises émigrées aux Etats-Unis adoptaient le régime alimentaire de la terre d'accueil (où l'incidence du cancer du sein est plus élevée qu'au Japon), leur risque de cancer du sein devenait alors équivalent à celui des américaines (Muir, 1996). Cela suggère que l'alimentation est capable d'influencer la survenue d'un cancer du sein et on estime qu'elle est mise en cause dans environ 30 % des cancers dans les pays industrialisés (Key *et al.*, 2002). Nous reviendrons de manière plus détaillée dans un autre chapitre sur le rôle des acides gras alimentaires dans l'apparition du cancer du sein, son évolution et sa réponse aux traitements anticancéreux. La relation entre cancer du sein et consommation d'alcool est également clairement établie (Boyle and Boffetta, 2009; Key *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008).

D'autres facteurs tels que l'âge avancé, une taille élevée des femmes à l'adolescence, les maladies bénignes du sein, la densité élevée de tissu mammaire en mammographie, l'obésité après la ménopause, la sédentarité, l'exposition à des radiations ionisantes, sont associés à un risque accru de cancer du sein (Gerber *et al.*, 2003; Nkondjock and Ghadirian, 2005). Une bonne hygiène de vie avec un maintien de l’équilibre énergétique et une activité physique régulière semblent au contraire avoir des effets préventifs.

C. Biologie du cancer du sein

Le cancer du sein est donc une maladie multifactorielle, et, comme tout mécanisme tumoral, la cancérogenèse mammaire est un processus multiphasique, en raison du caractère évolutif de la maladie pendant la période comprise entre l'exposition aux premiers carcinogènes et l'apparition de la tumeur. Aussi, s'il est difficile de définir précisément quels sont les facteurs et processus responsables du passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse, la majorité de la communauté scientifique semble accepter que cette transformation résulte de l'acquisition et la combinaison d'au moins six propriétés caractéristiques (**Figure 3**) : une autonomie vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération cellulaire, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération, la capacité de la cellule d'échapper aux systèmes déclenchant la mort cellulaire programmée (apoptose), l'acquisition d'un potentiel de réplication infini, la capacité des cellules tumorales à susciter la néo-angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (Hanahan and Weinberg, 2000).

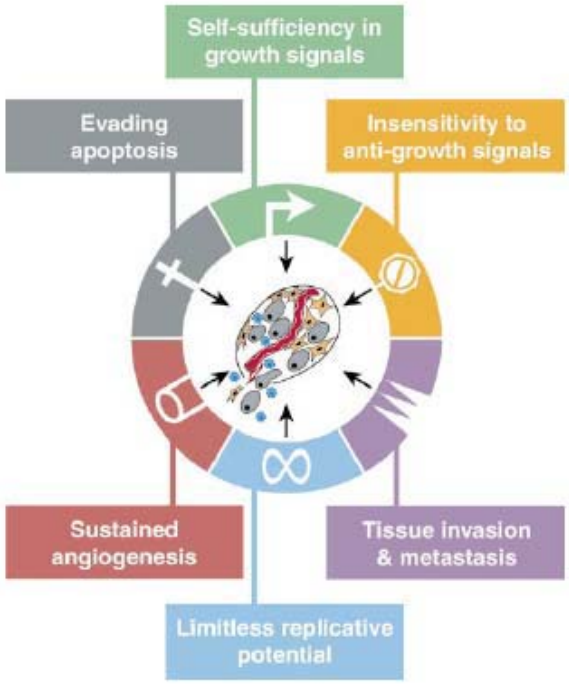


Figure 3 : Caractéristiques principales des cellules cancéreuses (tiré de Hanahan and Weinberg, 2000).

1. Les étapes de la cancérogénèse

D'une manière générale, la recherche sur le cancer de ces dernières décennies, et par conséquent aussi le traitement, sont bâtis sur la théorie dite de la mutation somatique. Cette vision correspond à l'accumulation d'altérations génétiques conférant un avantage sélectif aux cellules cancéreuses, par étapes successives. Cependant l'évolution d'un cancer semble plus complexe que la simple accumulation linéaire de mutations dans une cellule somatique donnée. Il est en effet plus probable que lorsqu'une cellule acquiert une nouvelle compétence et parvient à se glisser entre les mailles de contrôle, elle transmet ce nouveau caractère à toute sa descendance. Au sein de celle-ci, une cellule fera peut-être l'acquisition d'une compétence supplémentaire et ainsi de suite jusqu'à ce qu'une cellule finisse par franchir avec succès toutes les barrières de protection et donne alors naissance à une tumeur maligne (Evan and Vousden, 2001).

Les modèles expérimentaux ont permis d'établir que le processus de cancérogenèse se déroule en trois étapes (**Figure 4**) : initiation, promotion et progression (Farber, 1984; Harris, 1991; Hursting *et al.*, 1999; Jakobisiak *et al.*, 2003).

La première étape d'initiation se caractérise par une accumulation de mutations génétiques spontanées ou causées par l'exposition à des substances cancérigènes qui, en l'absence de réparation, deviennent permanentes et se transmettent à la descendance cellulaire. Ces altérations génétiques peuvent conduire à la surexpression de gènes appartenant à la famille des oncogènes et/ou à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire. La conséquence de ces mutations est une surexpression de facteurs pro-oncogéniques. Un certain nombre de proto-oncogènes ont été décrits, comme RAS, MYC ou HER2. La mutation des gènes suppresseurs de tumeurs, comme par exemple BRCA1 et BRCA2, peut également entrainer une perturbation des systèmes de réparation ou de mort cellulaire programmée. Ces cellules "initiées", génétiquement anormales, sont toujours contrôlées par l'environnement cellulaire. A ce stade, elles peuvent rester à l'état latent, c'est-à-dire sans exprimer leur potentialité oncogène, sur une longue période.

Lorsque les cellules entrent dans la seconde étape, dite de promotion, elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, grâce aux pro-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Elles passent alors d'un état quiescent à un état prolifératif. Cette phase va donner naissance à des clones cellulaires. Ceci correspond à la formation d'une lésion précancéreuse, puis d'une tumeur bénigne. L'autonomie peut s'acquérir

de plusieurs manières, par exemple par la mise en place d'un contrôle autocrine en synthétisant un certain nombre de facteurs, en surexprimant des récepteurs transducteurs de signaux, ce qui entraine la prolifération cellulaire (Eccles, 2001), ou en surexprimant des facteurs de transcription qui induisent la prolifération cellulaire, comme par exemple le proto-oncogène MYC (Hynes and Lane, 2001).

La dernière étape, dite de progression, conduit à l'acquisition de la malignité et à l'expression clinique du cancer. Cette phase évolutive peut se poursuivre localement par un envahissement plus profond du tissu de soutien, mais elle aboutit parfois à une extension à distance. Les cellules sont alors disséminées dans l'organisme par la voie lymphatique ou par la voie sanguine, conduisant à la formation de métastases. Cette dernière phase suppose l'acquisition irréversible d'anomalies génétiques supplémentaires, spontanées ou sous l'effet d'une nouvelle exposition à des substances carcinogènes. La probabilité d'apparition de ces nouvelles mutations est d'autant plus grande que les cellules initiées sont déficientes pour leurs systèmes de réparation et prolifèrent beaucoup. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est l'acquisition d'un avantage sélectif par rapport aux cellules normales qui permet aux cellules cancéreuses de proliférer et d'aller jusqu'à la formation de tumeurs.

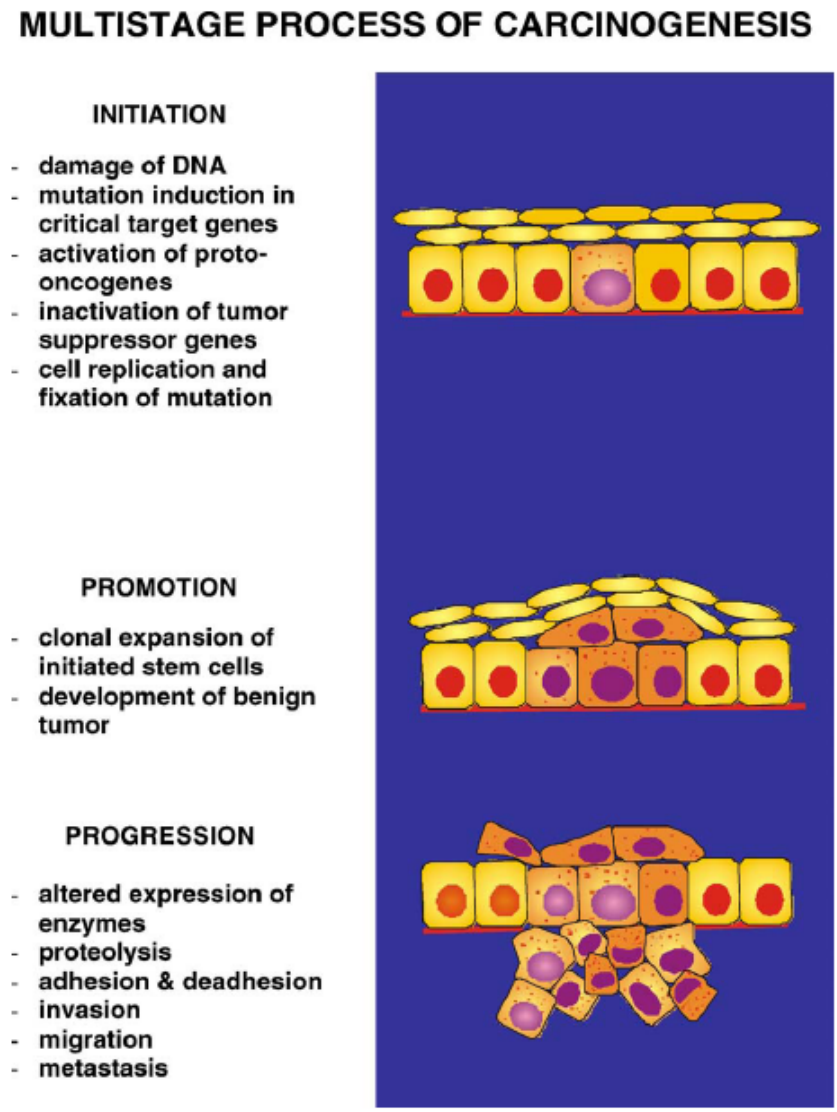


Figure 4 : Processus multi-étapes de cancérogenèse (tiré de Jakobisiak *et al.*, 2003).

2. Le développement de la tumeur : rôle du micro-environnement tumoral

La tumeur est composée de multiples cellules telles que les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules du système immunitaire, les cellules qui forment les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le stroma du sein participe à la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules mammaires normales et cancéreuses, et dans le cas de la constitution d'une tumeur, il se produit donc un détournement non seulement des cellules stromales, mais aussi des systèmes immunitaire et vasculaire. De nombreux travaux ont montré que les cellules stromales, comprenant non seulement les fibroblastes mais aussi

les myoblastes, les leucocytes et les myofibroblastes, interviennent dans le potentiel d'invasion et de métastases des cellules cancéreuses (Bissell and Radisky, 2001). Le stroma est donc une composante très importante de la tumeur, quantitativement, puisqu'il représente près de la moitié de la masse tumorale, mais aussi qualitativement, puisque c'est lui qui va apporter la vascularisation tumorale nécessaire à l'apport en nutriments, aux échanges gazeux, à l'élimination des déchets, etc … (**Figure 5**). Le profil d'expression génique des cellules stromales dans l'environnement d'un cancer du sein est différent de celui des mêmes cellules dans le tissus normal, avec pour exemple les chimiokines CXCL14 et CXCL12 qui sont surexprimées, respectivement dans les cellules myoépithéliales et les myofibroblastes et qui, en liant leurs récepteurs sur les cellules épithéliales, favorisent leur prolifération, leur migration et leur pouvoir d'invasion (Allinen *et al.*, 2004).

Alors que le système immunitaire est supposé détruire les cellules ou les tissus endommagés, la réaction inflammatoire chronique potentialise le développement du cancer et la présence de cellules de l'immunité telles que les macrophages et les mastocytes est associée à un mauvais pronostic des cancers et notamment du sein. Des études ont retrouvé une corrélation entre le nombre de macrophages ou de granulocytes et le développement de la néoangiogenèse tumorale. Ces cellules agissent par différentes voies (Bissell and Radisky, 2001; Joyce and Pollard, 2009; Tlsty and Coussens, 2006) :

- la production de métalloprotéases qui régulent l'homéostasie tissulaire en remodelant les composants solubles et insolubles de la matrice extracellulaire ainsi que les molécules d'adhésion cellule-cellule et matrice-cellule (comme la MMP-9 produite par les macrophages et qui joue un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse en mobilisant le VEGF séquestré par la matrice extracellulaire et en stimulant la prolifération des cellules endothéliales vasculaires).
- les prostaglandines (les cellules stromales et les cellules immunitaires en particulier sont connues pour stimuler la production de la cyclo-oxygénase-2 ou COX2) qui agiraient en favorisant la survie cellulaire et en régulant les différentes voies métaboliques de l'angiogenèse.
- les cytokines pro-inflammatoires, et notamment celles qui sont des médiateurs pro-angiogéniques tels que le TNF alpha, le TNF beta, le VEGF et les interleukines IL-1 et IL-6.

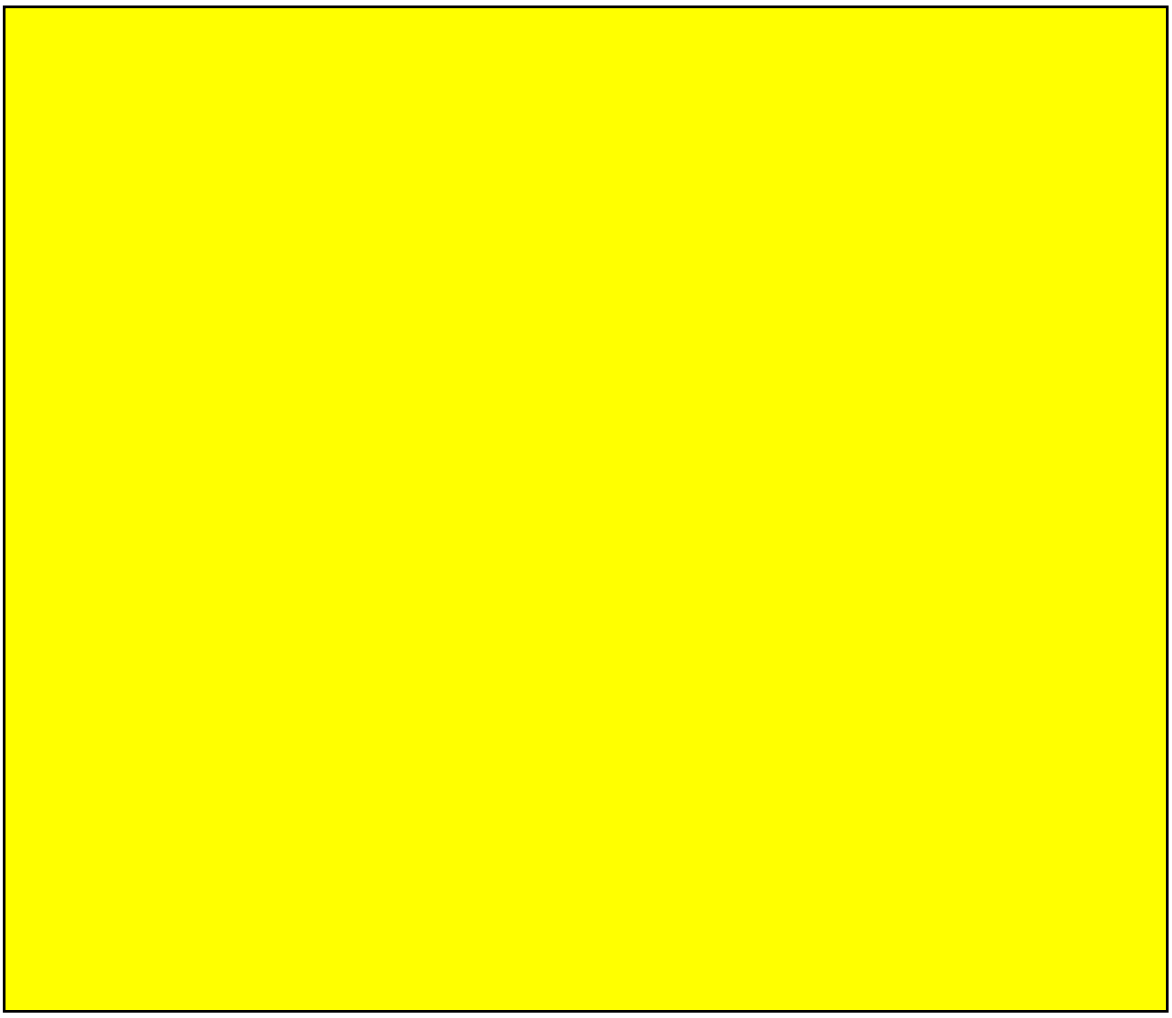


Figure 5 : Micro-environnement de la tumeur primaire (tiré de Joyce and Pollard, 2009).

3. La dissémination des cellules cancéreuses et la formation de métastases

La progression de la tumeur primaire peut conduire à la formation de nouvelles tumeurs au niveau de tissus et organes plus éloignés, ce sont les métastases. Les métastases, plus que les tumeurs primaires, sont responsables de la plupart des décès par cancer. En effet, lorsqu'un cancer est détecté à un stade précoce, avant qu'il n'ait disséminé, le pronostic de traitement est relativement bon, alors que s'il est détecté après l'apparition de métastases, les traitements ont beaucoup moins de succès (Chambers *et al.*, 2002).

Le développement de métastases résulte de la succession de différentes étapes (**Figure 6**) qui correspondent à :

- la dissémination des cellules à partir de la tumeur primaire
- l'atteinte de la circulation sanguine (intravasation)
- la survie dans la circulation sanguine
- l'arrêt au niveau d'un nouvel organe
- l'extravasation dans les tissus environnants
- la vascularisation et la croissance de la tumeur secondaire

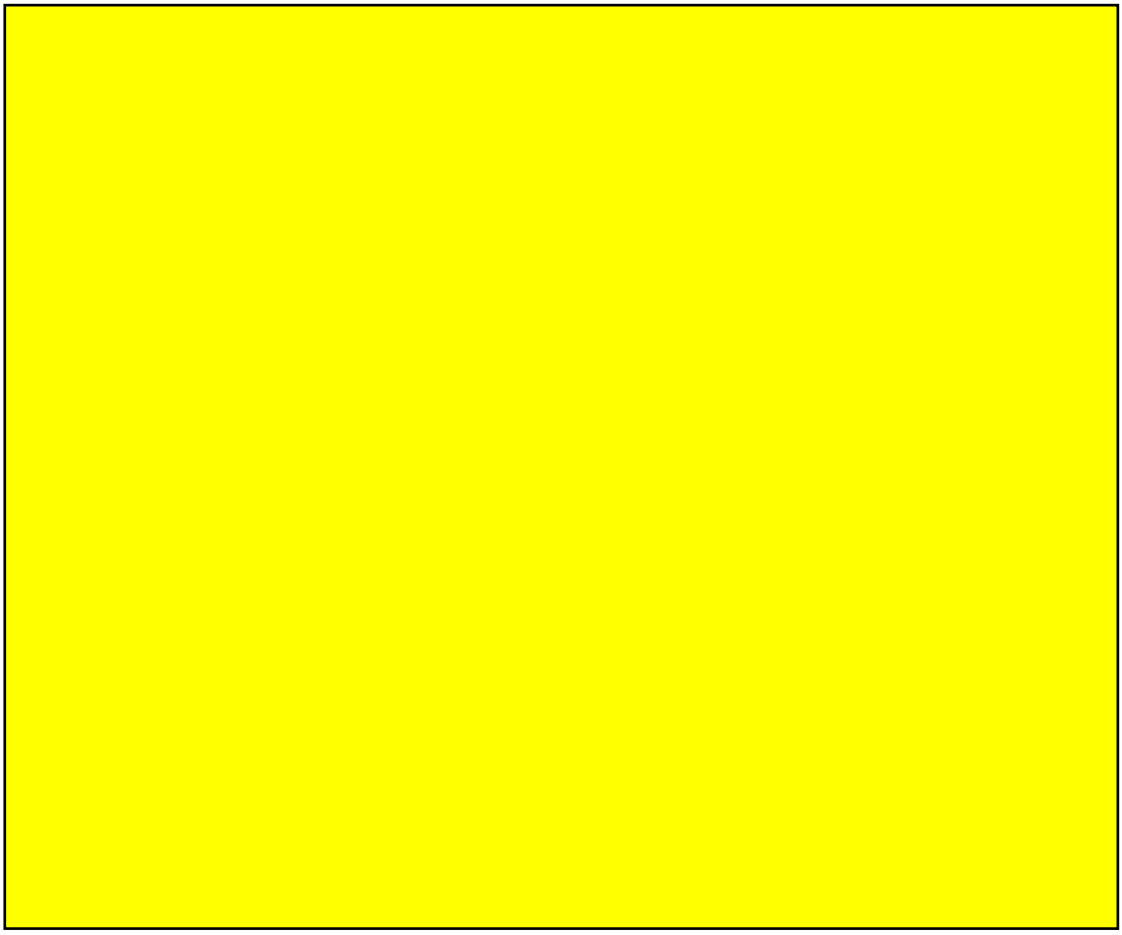


Figure 6 : Les principales étapes de la formation de métastases (Fidler, 2003).

Il est reconnu que certains types de cancers peuvent présenter une spécificité d'organe, en ce qui concerne la dissémination des cellules cancéreuses. Ainsi, de manière assez fréquente, les cancers du sein métastasent préférentiellement au niveau des os, du foie, du cerveau et des poumons ; les cancers de la prostate au niveau des os et les cancers colorectaux au niveau du foie. Cette spécificité d'organe, qui en outre nécessite l'intervention de molécules de reconnaissance et d'adhésion cellulaire, est liée à la fois aux cellules cancéreuses et aux facteurs du microenvironnement des sites métastatiques.

Des facteurs mécaniques influencent la dissémination des cellules cancéreuses après qu'elles aient quitté la tumeur primaire. En effet, les cellules cancéreuses mammaires qui s'échappent dans la circulation sanguine seraient emportées par le flux sanguin, en passant par le cœur, avant d'arriver au niveau des capillaires des poumons, où elles s'arrêteraient. La taille des cellules et des capillaires, entre autres, vont conditionner le fait que les cellules s'arrêtent au niveau de l'organe ou qu'elles regagnent la circulation sanguine et atteignent d'autres organes. D'autres cellules pourraient également envahir les vaisseaux lymphatiques à partir de la tumeur primaire, atteindre les ganglions lymphatiques et y développer une tumeur secondaire ou éventuellement regagner la circulation sanguine pour atteindre d'autres sites (os, foie cerveau et poumons). Une fois que les cellules ont atteint un organe, leur capacité d'y développer une tumeur dépend des interactions moléculaires avec le microenvironnement.

Les processus de migration et d'invasion mettent en jeu différents mécanismes (Friedl and Wolf, 2003) tels que:

- l'acquisition d'un profil cellulaire de type migratoire, avec des élongations et l'émission de pseudopodes
- la réalisation de contacts avec la matrice et la constitution de contacts focaux (avec souvent l'intervention d'intégrines)
- la dégradation de la matrice, faisant alors intervenir des protéases telles que les MMP (métalloprotéases matricielles) ou des membres des sérine-protéases (ex : kallicréines) et cystéine-protéases (ex: cathepsines)
- la mise en jeu du cytosquelette avec le développement de ponts d'acto-myosine

Les métastases peuvent également survenir plusieurs années après le traitement d'une tumeur primaire et ces tumeurs en dormance peuvent s'expliquer par la présence de "micro métastases pré-angiogéniques" qui par la suite peuvent être vascularisés, ou par l'existence de cellules solitaires qui restent sans se diviser pendant une durée prolongée au niveau du site secondaire. Ces cellules seraient résistantes aux thérapies cellulaires qui visent les cellules à division rapide.

Le dépistage de masse et l’amélioration des traitements adjuvants sont les deux axes fondamentaux pour permettre d'augmenter substantiellement et durablement la survie des patientes atteintes de cancer du sein. Cependant, le traitement du cancer du sein au stade de métastases reste un enjeu médical et de santé publique considérable. Aussi, la compréhension

des mécanismes conduisant à la formation de métastases est indispensable au développement de nouvelles thérapies visant à prévenir leur apparition. L'implication des canaux ioniques dans les processus oncogéniques est maintenant bien admise et ils pourraient en ce sens constituer de nouvelles cibles pour les thérapies anticancéreuses.

II. Canaux ioniques et cancer

Les canaux ioniques font partie, tout comme les pompes et les échangeurs, des protéines responsables du maintien des différences de potentiel électrique de part et d'autre des membranes cellulaires, très importantes pour un grand nombre de fonctions cellulaires. Ce sont des protéines transmembranaires qui forment des pores permettant la diffusion passive d'ions à travers les membranes biologiques. Ces transports sont très peu énergétiques, et en général plus ou moins sélectifs pour des espèces ioniques particulières. Ils sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires, aussi bien dans les cellules excitables, où ils permettent la genèse et la propagation de potentiels d'action (Hille, 1992), que dans les cellules non excitables. Ainsi, ils peuvent être impliqués dans le transport transépithélial d'eau et de solutés, la régulation du pH et du volume cellulaire (Deutsch and Lee, 1988), les phénomènes de sécrétion (Rahamimoff *et al.*, 1999), l'adhésion cellulaire (Itoh *et al.*, 1995), l'apoptose (Chin *et al.*, 1997), l'activation lymphocytaire (DeCoursey *et al.*, 1984), *etc.*… On comprend alors que des dysfonctionnements de ces canaux puissent être associés à des pathologies (canalopathies), comme la mucoviscidose (conductances chlorures), des pathologies du système neuromusculaire comme l'épilepsie et des arythmies cardiaques (canaux sodiques), certains types de diabète (canaux potassiques), et bien d'autres encore (Aschcroft, 2000).

Les canaux ioniques sont également connus pour leur implication dans la régulation des phénomènes de croissance et de prolifération cellulaires, à la fois dans des conditions normales et pathologiques (Dubois and Rouzaire-Dubois, 1993; Nilius *et al.*, 1996; Wonderlin and Strobl, 1996; Yao and Kwan, 1999), et de plus en plus d'études indiquent désormais qu'ils interviennent dans les phénomènes de prolifération et de croissance tumorale, ainsi que dans les mécanismes impliqués dans la cascade métastatique tels que la migration et l'invasion cellulaires.

Un certain nombre de revues récentes relatent de manière très complète les principaux concepts reliant les canaux ioniques au cancer, que ce soit au niveau de leur rôle dans les différentes fonctions cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la migration, l'invasion et l'angiogenèse (**Figure 7**), ou de leur régulation et de leur expression spécifique dans certains cancers (Arcangeli *et al.*, 2009; Fiske *et al.*, 2006; Fraser and Pardo, 2008; Kunzelmann,

2005; Le Guennec *et al.*, 2007; Prevarskaya *et al.*, 2010; Schonherr, 2005). D'autres revues concernant l'implication plus spécifiquement d'un canal ou d'une famille de canaux, dans un type de cancer en particulier, viennent également enrichir de manière détaillée la littérature (Bodding, 2007; Flourakis and Prevarskaya, 2009; Ouadid-Ahidouch and Ahidouch, 2008; Pardo and Stuhmer, 2008; Prevarskaya *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2006; Villalonga *et al.*, 2007).

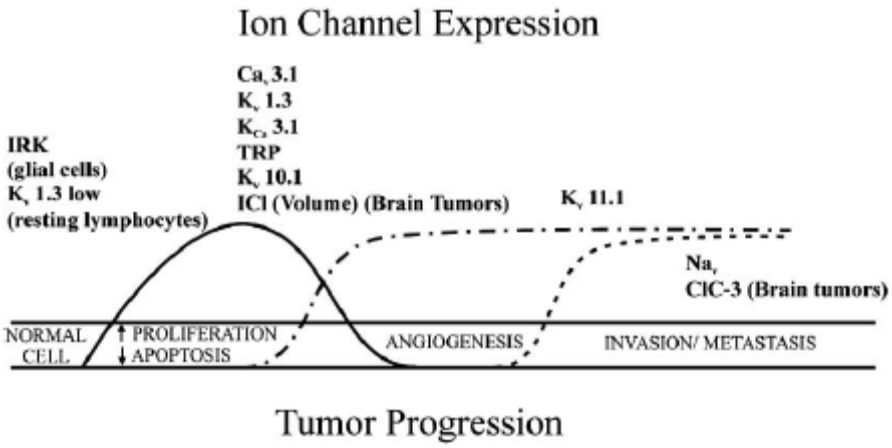


Figure 7 : Expression de différents canaux ioniques au cours de la progression tumorale (tiré de Arcangeli *et al.*, 2009).

Les canaux ioniques sont extrêmement divers, et des centaines de canaux ont été décrits. Ils peuvent être classés selon les espèces ioniques qui les traversent, principalement les ions sodium, calcium, potassium, protons et chlorures. Leur classification peut aussi être basée sur les stimuli qui permettent leur ouverture et, parmi ces différents stimuli, les changements de potentiel de membrane peuvent réguler l'activité de certains canaux ioniques appelés "voltage-dépendants". Dans la superfamille des canaux dépendants du voltage (**Figure 8**) on retrouve notamment les canaux potassiques de type K_V, Kir, K_{Ca}, K_{2P}, les canaux de type TRP (Transient Receptor Potential) qui sont des canaux cationiques non sélectifs, les canaux cationiques CNG (Cyclic Nucleotide-Gated) et HCN (Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated) régulés par les nucléotides cycliques, les canaux calciques à deux pores (TPC), les canaux calciques voltage-dépendants de type Ca_V et enfin les canaux sodiques dépendants du voltage (Na_V) auxquels nous allons plus particulièrement nous intéresser.

Ainsi, selon la base de données IUPHAR (Harmar *et al.*, 2009), la superfamille des canaux ioniques dépendants du voltage regroupe 10 familles de canaux, dont le module de base est un motif relativement simple constitué de deux segments transmembranaires (2-TM) séparés par une boucle (boucle P) repliée à l'intérieur de la membrane, et qui forment ainsi le pore et le filtre de sélectivité cationique du canal (Yu *et al.*, 2005) (**Figure 8**). Les canaux Kir (canaux potassiques à rectification entrante), qui semblent être les plus proches de l'ancêtre commun de cette superfamille de canaux, sont uniquement constitués de ce module de base, qui s'assemble en tétramère pour former un canal. Il existe une famille de canaux pour laquelle deux modules de base sont liés pour former les canaux potassiques à deux domaines pore (K_{2P}). Pour la majorité des canaux de cette famille, au motif de base à 2-TM vient s'ajouter un motif supplémentaire de quatre segments transmembranaires pour former une protéine à six segments transmembranaires (6-TM). Le pore du canal se situe au niveau des segments S5 et S6 et dans le cas des canaux activés par le voltage (K_V, Ca_V, Na_V) le segment S4 est le détecteur de voltage primaire (Catterall, 1986b; Guy and Seetharamulu, 1986) (selon les modèles, le segment S3, voire les segments S1 à S3, pourraient également prendre part à la régulation de la voltage-dépendance). Les variations de potentiel de membrane entrainent des déplacements de charges correspondant à une rotation du segment S4 (qui contient des résidus acides aminés chargés positivement) et conduisent alors à un changement de conformation du canal, ce qui permet le passage des ions. Dans le cas des K_V cette struture de base (qu'on appelle sous-unité α) doit s'assembler en tétramère pour former un canal. D'autres familles de canaux ioniques, appartenant à la superfamille des canaux voltage-dépendants, mais qui ne sont pas activés par le voltage du fait, entre autres, de modifications au niveau du segment S4, ont aussi cette architecture de base : les canaux de type K_{Ca} (activés par le calcium intracellulaire), CNG, HCN et TRP. Enfin, les canaux Na_V et Ca_V apparaissent, d'un point de vue structural, comme les plus complexes de cette superfamille : alors que dans le cas des K_V, chaque domaine est formé d'une protéine distincte, pour les canaux sodiques et calciques, le pore est constitué d'une unique protéine qui comprend les quatre domaines (I à IV) (Catterall, 1988; Noda *et al.*, 1984). Le premier membre de la famille des canaux voltage dépendants à avoir été cloné est le canal sodique (Noda *et al.*, 1984) ; c'est précisément à ces canaux sodiques voltage-dépendants que nous allons à présent nous intéresser.

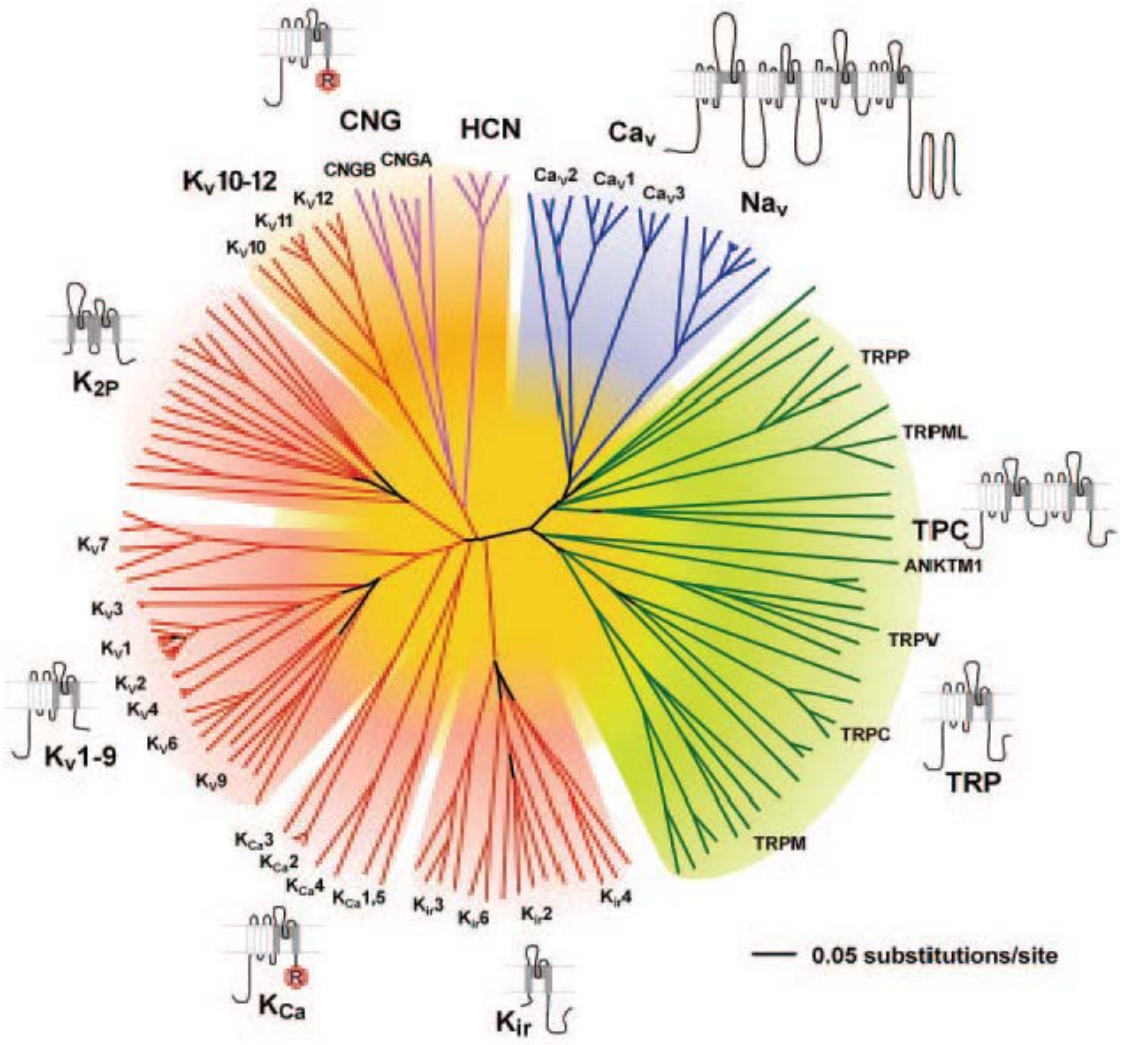


Figure 8 : Dendrogramme représentant les canaux ioniques classés dans la superfamille des canaux voltage-dépendants, selon la nomenclature IUPHAR (tiré de Yu *et al.*, 2005).

A. Canaux sodiques dépendants du voltage

Les canaux sodiques dépendants du voltage sont les intervenants indispensables de l'initiation et de la propagation des potentiels d'action, puisque responsables de la phase initiale de dépolarisation membranaire. On les retrouve ainsi exprimés classiquement dans les cellules dites "excitables" que sont les cellules nerveuses du système nerveux central et périphérique ainsi que dans les cellules musculaires. Il apparaît que les canaux sodiques dépendants du voltage sont aussi exprimés dans des cellules dites "non-excitables" telles que les cellules gliales (Chiu *et al.*, 1984), les lymphocytes (Chandy *et al.*, 1985), les cellules endothéliales

(Gordienko and Tsukahara, 1994), les fibroblastes (Bakhramov *et al.*, 1995), les ostéoclastes (Gaspar *et al.*, 1995), les ostéoblastes (Black and Waxman, 1996), et plus récemment dans des cellules cancéreuses d'origine épithéliale (Grimes *et al.*, 1995; Laniado *et al.*, 1997; Roger *et al.*, 2003).

1. Structure et propriétés

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont des gros complexes protéiques multimériques, composés d'une sous-unité principale α d'environ 260 kDa associée à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires β de 33 à 38 kDa (Catterall, 2000) (**Figures 9 et 10**). La sous-unité α, responsable des différentes propriétés d'activation, de sélectivité ionique et d'inactivation, est nécessaire et suffisante au fonctionnement du canal, et les sous-unités β en modifient les cinétiques et la dépendance au voltage. Ces canaux sodiques ont en effet la particularité de s'activer rapidement, puis de s'inactiver en fonction du voltage et du temps. Cette inactivation présente deux composantes que l'on différencie en fonction de leur cinétique : une inactivation rapide et une inactivation lente.

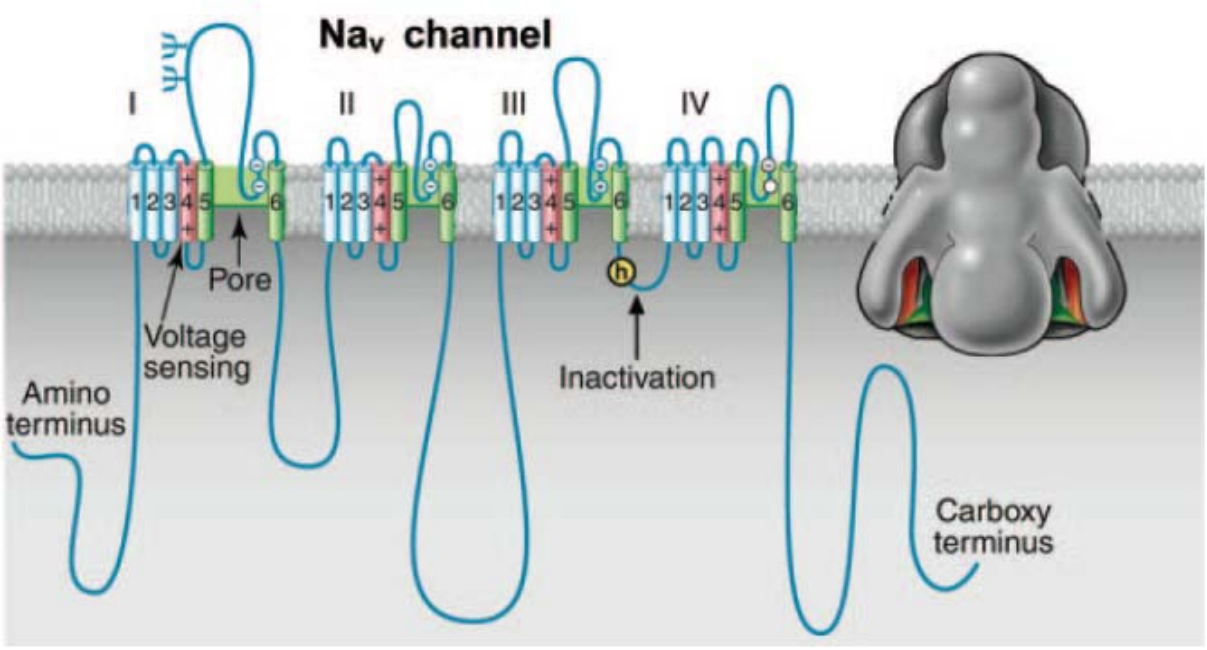


Figure 9 : Structure des canaux sodiques voltage-dépendants (tiré de Yu *et al.*, 2005).

A gauche : représentation schématique de la sous unité α du canal sodique. Les cylindres numérotés représentent des hélices α. Les chiffres romains indiquent les 4 domaines homologues. A droite : structure 3D de la sous-unité α Na$_V$ à une résolution de 20 Å. Adapté d'après Sato et al. (2001) et Yu & Catterall (2004).

La sous-unité alpha

La sous-unité α du canal sodique est formée de quatre domaines homologues notés I à IV (**Figure 9**). Chaque domaine comprend six segments transmembranaires (S1 à S6) et ressemble donc à une simple sous-unité de canal potassique dépendant du voltage. Les quatre domaines se replient sur eux-mêmes de façon à former un pore central. Une boucle P est présente au niveau de chacun des quatre domaines, entre les segments S5 et S6 (aussi appelée "S5-S6 linker"). Le segment S4 (détecteur de voltage) de chaque domaine contient des résidus chargés positivement (arginine ou lysine) tous les trois acides aminés ; c'est la zone qui va percevoir les variations de voltage membranaire pour les transmettre au reste du canal sodique. De petites boucles extracellulaires connectent les différents segments transmembranaires entre eux et peuvent faire l'objet de glycosylations, la plus grande étant celle qui relie les segments S5 et S6 à la boucle P. Des boucles intracellulaires plus grandes relient les quatre domaines homologues entre eux et sont le siège de nombreux sites de régulation du canal. La petite boucle intracellulaire qui relie les domaines III et IV constitue la boucle d'inactivation qui, lors d'une dépolarisation membranaire maintenue, va se replier contre le canal et fermer le pore (Stuhmer *et al.*, 1989). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont très grandes et situées toutes les deux du côté cytoplasmique. Elles contribuent à la formation de la face intracellulaire du canal.

Plusieurs isoformes de canaux sodiques voltage-dépendants ont été décrites chez les mammifères et au total 10 gènes codant pour différentes sous-unités α ont été identifiés chez l'humain (Goldin, 2001). Le nom attribué à chaque sous-unité α est constitué du symbole chimique de l'ion perméant (Na), avec en indice l'initiale du principal régulateur, le voltage : Na_v. Le chiffre qui suit désigne alors la sous-famille de gènes, jusqu'à présent il n'en existe qu'une seule : Na_v1, qui regroupe les 9 gènes notés $Na_V1.1$ à $Na_V1.9$ ainsi qu'un gène codant une isoforme particulière appelée Na_X (Goldin, 2001; Yu and Catterall, 2003). Le chiffre après le point désigne spécifiquement l'isoforme de canal ($Na_V1.1$, $Na_V1.2$, …). Les différentes isoformes peuvent être regroupées en fonction de leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX), un bloqueur très puissant et très sélectif des canaux sodiques, isolé notamment à partir des bactéries du tube digestif de poissons globes (genre *Takifugu*), capable d'obstruer le pore du canal, de manière rapide et réversible. Ainsi, les isoformes $Na_V1.1$ à $Na_V1.4$, $Na_V1.6$ et $Na_V1.7$, sont dites "TTX-sensibles" (TTX-S) alors que les isoformes $Na_V1.5$, $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$, pour lesquelles la TTX a une affinité plus faible, sont dites TTX-résistantes (TTX-R).

En effet, il faut des concentrations de TTX plus élevées (supérieures au micromolaire) pour pouvoir bloquer ces dernières Dans le cas de $Na_V1.5$, cette résistance semble être due à la substitution d'un seul acide aminé au niveau du domaine I : un résidu aromatique (phénylalanine) des isoformes TTX-S, est remplacé par un acide aminé polaire (cystéine), diminuant alors d'environ 200 fois la sensibilité du canal à la TTX (Satin *et al.*, 1992). Les différentes isoformes de sous-unités α présentent toutes des tissus préférentiels d'expression : ainsi les quatre isoformes $Na_V1.1$, $Na_V1.2$, $Na_V1.3$ et $Na_V1.6$ sont très fortement exprimées au niveau du système nerveux central (SNC). Deux isoformes sont dites musculaires, il s'agit de $Na_V1.4$ qui est exprimée de façon très abondante dans le muscle squelettique, et de $Na_V1.5$ que l'on retrouve dans le muscle squelettique embryonnaire ou dénervé, et surtout dans le muscle cardiaque. Les isoformes $Na_V1.7$, $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$ sont essentiellement retrouvées au niveau du système nerveux périphérique (SNP). Le **tableau 1** permet de récapituler brièvement les différentes isoformes de canaux sodiques voltage-dépendants retrouvées chez l'humain, ainsi que leur localisation. En plus des 9 isoformes de sous-unités α de canaux sodiques vues précédemment, des protéines apparentées à des canaux sodiques dépendants du voltage ont été clonées chez la souris, le rat et l'homme : Na_X (George *et al.*, 1992). Bien que présentant approximativement 50% d'identité avec la famille de canaux Na_V1, ces canaux atypiques présentent des différences en particulier au niveau de motifs très importants tels que le détecteur au voltage (segment S4), la porte d'inactivation (boucle reliant les domaines III et IV, au niveau du motif IFM (isoleucine, phénylalanine, méthionine)) et la région du pore. Ce canal semblerait en fait être plutôt régulé par la concentration de Na^+ extracellulaire que par le voltage (Grob *et al.*, 2004).

Canaux	Gènes	Localisation Chromosomique	Autres noms	Taille (en AA)	TTX IC_{50}	Distribution tissulaire principale
$Na_v1.1$	SCN1A	2q24	Brain type I, HBSCI	1998	TTX-sensible	Système nerveux central (Whitaker *et al.*, 2000)
$Na_v1.2$	SCN2A	2q23-24	Brain type II, HBSCII	2005	TTX-sensible	Système nerveux central (Whitaker *et al.*, 2000)
$Na_v1.3$	SCN3A	2q24	Brain type III	2000	TTX-sensible	Système nerveux central et cœur (Thimmapaya *et al.*, 2005)
$Na_v1.4$	SCN4A	17q23-25	SkM1	1836	25 nM (TTX-S)	Muscle squelettique (Trimmer *et al.*, 1989)
$Na_v1.5$	SCN5A	3p21	H1	2016	6 µM (TTX-R)	Cœur (Gellens *et al.*, 1992)
$Na_v1.6$	SCN8A	12q13	Scn8a	1980	TTX-sensible	Système nerveux central (Whitaker *et al.*, 1999)
$Na_v1.7$	SCN9A	2q24	hNE-Na	1977	25 nM (TTX-S)	Neurones des ganglions spinaux, Cellules de Schwann, Cellules neuroendocrines (Sangameswaran *et al.*, 1997)
$Na_v1.8$	SCN10A	3p21-24		1956	60 mM (TTX-R)	Système nerveux périphérique
$Na_v1.9$	SCN11A	3p21-24	hNaN, SCN12A	1791	40 mM (TTX-R)	Système nerveux périphérique
Na_x	SCN7A (et SCN6A)	2q21-23	$Na_v2.1$	1682	1 µM	Cœur, Utérus

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes isoformes des sous-unités alpha de canaux sodiques chez l'humain (modifié d'après Goldin, 2001 et http://www.iuphar-db.org/PRODDATABASE/FamilyMenuForward?familyId=82). **TTX-S = TTX-sensible, TTR-R = TTX-résistant (sensibilité à la TTX pour une concentration supérieure au micromolaire).**

Les canaux sodiques sont très sélectifs pour le sodium (100 fois plus spécifiques pour le sodium que pour les autres cations) et le débit d'ions passant par un canal ouvert est estimé à 10^7 ions par seconde. Ce sont les boucles qui relient les segments S5 à S6 de chaque domaine (boucles P) qui se replient dans la membrane et forment un pore aqueux sélectif au sodium. Il est proposé que des résidus d'acides aminés majoritairement chargés négativement soient impliqués dans la formations de deux anneaux au niveau du pore et constituent ainsi le filtre de sélectivité (Noda *et al.*, 1989; Terlau *et al.*, 1991). Le premier anneau, considéré comme externe, est constitué de résidus acides, aspartate (D) et glutamate (E), qui forment le motif EEDD. Le deuxième anneau comprend un aspartate et un glutamate au niveau des domaines I et II, un résidu basique, une lysine (K) sur le domaine III et un résidu neutre, une alanine, sur le domaine IV, formant le motif DEKA. Le modèle de filtre de sélectivité des canaux sodiques réalisé par Lipkind et Fozzard suggère qu'une molécule d'eau est stabilisée par des liaisons hydrogène avec les résidus K et E du motif DEKA (Lipkind and Fozzard, 2000). L'ion Na^+ déplace alors la molécule d'eau et interagit avec les résidus D et E, tandis que la lysine se rapproche de l'alanine pour réaliser une chambre pour le Na^+. Dans un autre modèle, il est proposé que le filtre de sélectivité soit occupé presque tout le temps par deux ions Na^+ et qu'un troisième ion entrant du côté extracellulaire soit alors nécessaire pour propulser un des deux ions dans la région centrale du canal et permettre son passage du côté intracellulaire (Vora *et al.*, 2005). Ce modèle a été mis au point à partir des informations connues de la structure du canal KcsA cristallisé (Doyle *et al.*, 1998) ainsi que de la structure tridimensionnelle des canaux sodiques par microscopie cryo-électronique (Sato *et al.*, 2001). En effet les images obtenues par Sato et ses collaborateurs montrent quatre masses transmembranaires arrangées de façon symétrique autour d'une cavité placée sur un axe central perpendiculaire à la membrane. La cavité centrale n'est pas en relation directe avec les milieux intra et extracellulaires et semble plutôt y être reliée par sa séparation en quatre branches, à chaque extrémité du canal (**Figure 11**). On peut noter également la présence dans chaque domaine de quatre pores périphériques supplémentaires (pores de "gating") qui pourraient être des cavités hydrophiles recevant les segments S4 lors de leur mouvement suite à une dépolarisation membranaire.

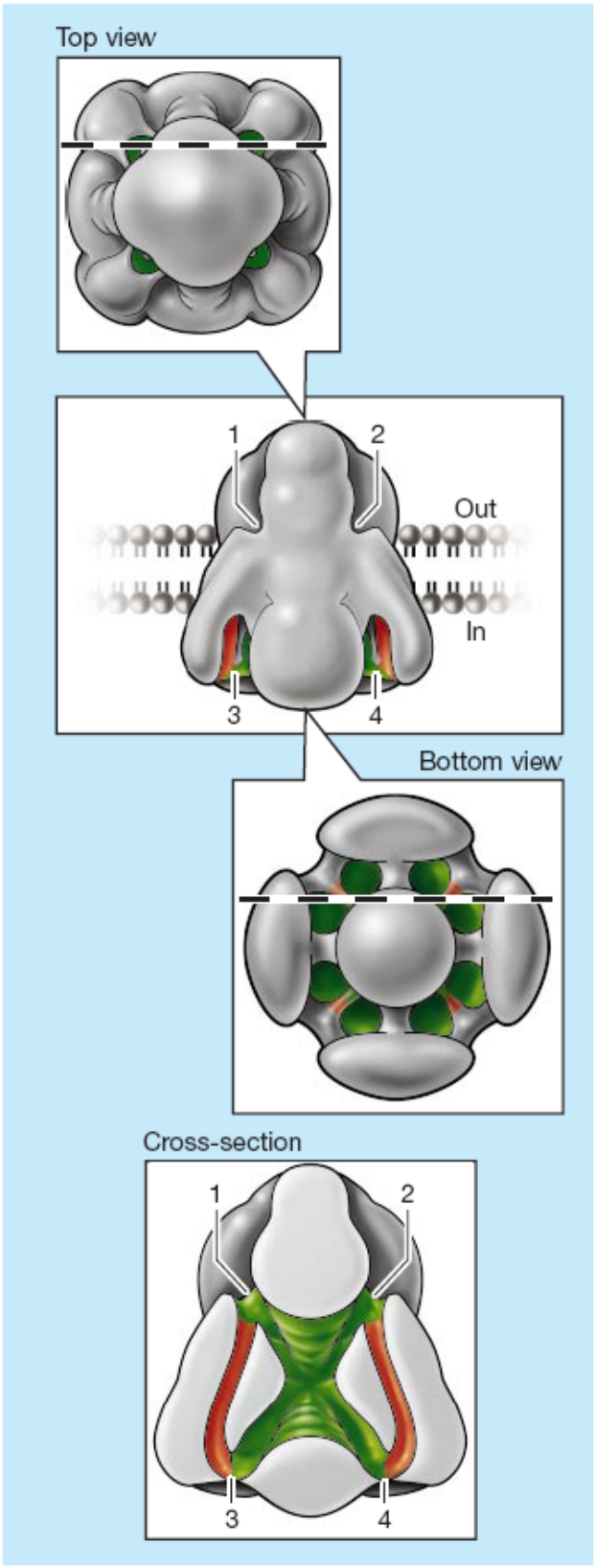


Figure 10 : Représentation 3D du Na_V (tiré de Catterall, 2001).

La structure verte indique le pore central pour la conduction des ions Na^+, avec les connections extra et intracellulaires. Les structures rouges désignent les« pores de gating » recevant les segments S4.

La localisation des segments S4 ainsi que leur mouvement sont encore sujets à controverses (Catterall and Yarov-Yarovoy, 2010; Elinder *et al.*, 2007). Les premières études réalisées sur les canaux sodiques étaient arrivées à la conclusion que le mécanisme de "gating" (activation dépendante du voltage) provenait du mouvement sortant de charges lors d'une dépolarisation (Armstrong, 1981; Hodgkin and Huxley, 1952). Ces mouvements de charges ont ensuite été mesurés et il est estimé que lors de l'activation, il y a déplacement de 12 à 16 charges positives à travers la membrane (Bezanilla, 2000). L'étude de la structure primaire des Na_v a montré que les segments transmembranaires S4 de chaque domaine contiennent des motifs répétés avec des acides aminés chargés positivement, du type lysine ou arginine, répartis tous les trois acides aminés, et séparés par des résidus non polaires. La structure des segments S4 forme alors une hélice amphiphile cylindrique présentant un bandeau de charges positives (**Figure 10**). Il est proposé que ces charges positives soient neutralisées et stabilisées dans l'environnement transmembranaire par la formation de liaisons avec des résidus appariés et chargés négativement. Lors d'une dépolarisation membranaire, sous l'effet du champ électrique, les segments S4 sont libérés de leurs liaisons électrostatiques et effectuent un mouvement de rotation et de soulèvement vers le milieu extracellulaire. Ceci entraîne un changement de conformation du canal et permet le passage des ions Na^+. C'est le modèle de la « sliding helix » (glissement d'helice) (Catterall, 1986a), ou de l'« helical screw » (mouvement de tire-bouchon) (Guy and Seetharamulu, 1986) (**Figure 10**). Yang et collaborateurs ont émis l'hypothèse que lors de l'activation, pour réaliser ce mouvement, les segments S4 de chaque domaine viennent se placer dans une gouttière (Yang *et al.*, 1997), gouttière qui pourrait correspondre aux pores de « gating » décrits par la suite par Sato et collaborateurs lors de la réalisation de l'image en 3D des canaux sodiques.

A partir des études en cristallographie menées par l'équipe de MacKinnon, un autre modèle est proposé. En effet ils suggèrent que S4 est plutôt localisé en périphérie, en contact avec les lipides, et réaliserait un mouvement de pagaie (« paddle ») conduisant à l'ouverture du canal (Jiang *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2005). Ainsi, dans les modèles « sliding helix » ou « helical screw », les segments S4 restent en position transmembranaire à l'état non activé et se déplacent par un mouvement d'hélice à travers la structure protéique lors de l'activation. En revanche dans le modèle « paddle », les segments S3 et S4 forment une épingle à cheveux qui se sépare du reste de la structure, se retrouvant proche de la surface intracellulaire à l'état non activé, et se déplaceraient alors à travers la bicouche lipidique lors de l'activation (**Figure 12**).

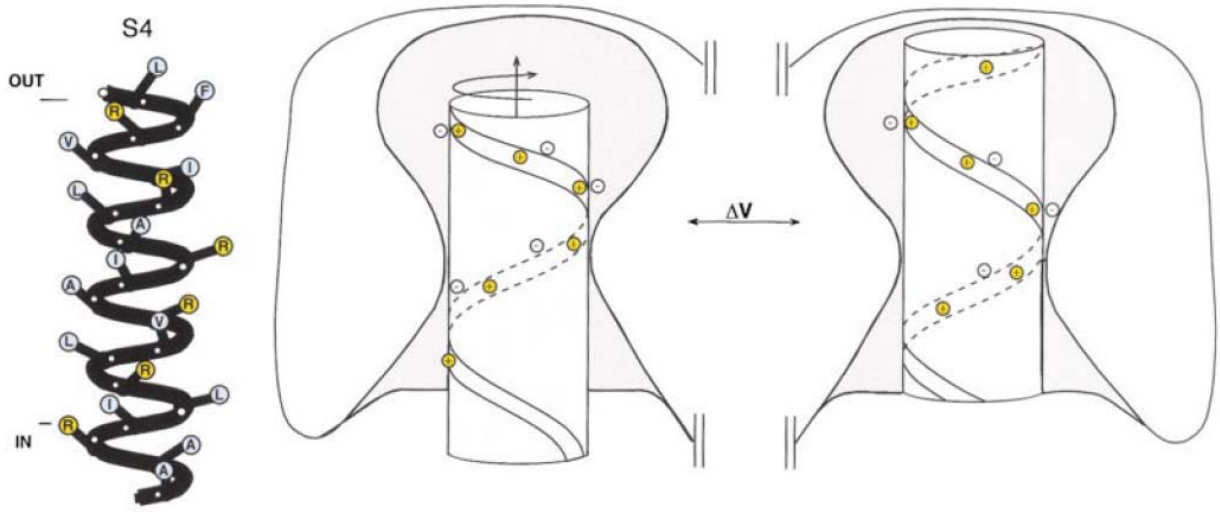


Figure 11 : Activation dépendante du voltage par mouvement sortant des détecteurs de voltage S4 (tiré de Catterall, 2000).

A gauche : Segment S4 du domaine IV du canal sodique. Les acides aminés hydrophobes sont indiqués en bleu, tandis que les résidus arginine chargés positivement et répartis tous les trois acides aminés sont représentés en jaune. A droite : Modèle de la « sliding helix » (Catterall, 1986a) ou « helical screw » (Guy and Seetharamulu, 1986) modifié par Yang *et al.* (Yang *et al.*, 1996). Le segment S4 est représenté comme un cylindre rigide situé dans une gouttière. Les charges positives en jaune sont neutralisées par leur interaction avec des résidus négatifs (principalement des segments S2 et S3). Lors d'une dépolarisation, le segment S4 effectue un mouvement de rotation vers l'extérieur, les charges positives sont alors neutralisées par d'autres charges négatives apportées par des résidus de la partie transmembranaire de la protéine

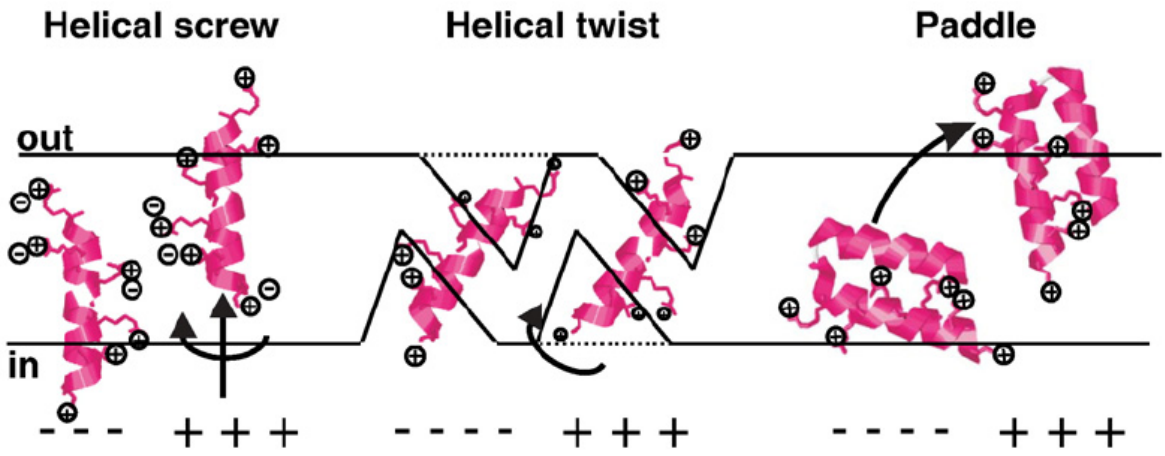


Figure 12 : Modèles moléculaires du mouvement du détecteur de voltage S4 (tiré de Elinder *et al.*, 2007).

On retrouve les deux modèles « helical screw » et « paddle », proposés pour le mouvement de S4 au moment de l'activation. Le 3ème modèle présenté ici, « helical twist », correspondrait à un mouvement de rotation de 180°, sans mouvement de translation.

En plus de la structure sensible au voltage qui va permettre l'activation du Na_V en fonction du potentiel de membrane, ce canal possède des structures qui vont intervenir dans son inactivation. L'inactivation est un état fermé particulier du canal qui intervient après quelques millisecondes d'ouverture lors d'une dépolarisation membranaire. Ainsi, l'inactivation clôt le canal et empêche sa réouverture avant un certain temps de réactivation. Dans les cellules excitables, ce mécanisme est très important puisque la réactivation va déterminer la fréquence maximale de décharge des potentiels d'actions et leur propagation directionnelle. Il existe au moins deux types d'inactivation, en fonction de leur cinétique : l'inactivation rapide et l'inactivation lente (un type d'inactivation ultra-lente a également été décrit) (Goldin, 2003).

L'inactivation rapide du Na_V se produit par un mécanisme de boule et de chaîne (« ball and chain »), au cours duquel la particule d'inactivation, qui correspond à une portion de la boucle intracellulaire qui relie les domaines III et IV (**Figures 9 et 14**), ferme le pore par son côté intracellulaire en se fixant sur une région particulière nommée « docking site » (site de garage) (Armstrong, 1981). En effet, cette boule se mettrait en mouvement dès l'ouverture du pore, et un motif hydrophobe constitué de trois acides aminés, isoleucine, phénylalanine, méthionine (IFM), viendrait l'obstruer (Kellenberger *et al.*, 1996; West *et al.*, 1992) (**Figure 13a**). Ce motif IFM viendrait se fixer au niveau du vestibule intracellulaire du pore du canal, en réalisant des interactions hydrophobes au moment de l'inactivation (Kellenberger *et al.*, 1997a). L'importance de la thréonine adjacente à la triade IFM a par la suite été soulignée et c'est pourquoi on parle aussi de motif IFMT (Kellenberger *et al.*, 1997b). L'équipe de Rohl et collaborateurs a par ailleurs décrit la structure 3D de la portion centrale de la porte d'inactivation, grâce à des méthodes de RMN multidimensionnelles, et a montré que ce segment était constitué d'une hélice α rigide en C-terminal du motif IFMT (Rohl *et al.*, 1999) (**Figure 13b**). Le site qui reçoit cette particule d'inactivation semble être constitué de nombreuses régions incluant les boucles reliant les segments S4 à S5 des domaines III et IV (Popa *et al.*, 2004), ainsi que la partie C-terminale du segment IV-S6 (McPhee *et al.*, 1995). Il a été proposé que lors du mouvement des détecteurs de voltage (S4) sous une dépolarisation membranaire, les groupes hydrophobes situés sur le segment reliant S4 à S5 étaient dévoilés et exposés de façon à interagir avec la particule d'inactivation (Miyamoto *et al.*, 2001). L'extrémité C-terminale du canal, comme l'ont démontré des études avec l'isoforme $Na_V1.5$, semble également moduler l'inactivation, en interagissant avec la boucle intracellulaire qui est responsable de cette inactivation rapide ; cette interaction permet de maintenir le canal à l'état

inactivé pendant une dépolarisation prolongée (Kass, 2006). D'autres études, enfin, ont montré que l'interaction avec les sous-unités β pouvait aussi moduler l'inactivation rapide des canaux sodiques (Chen and Cannon, 1995; McCormick *et al.*, 1999; Meadows *et al.*, 2002).

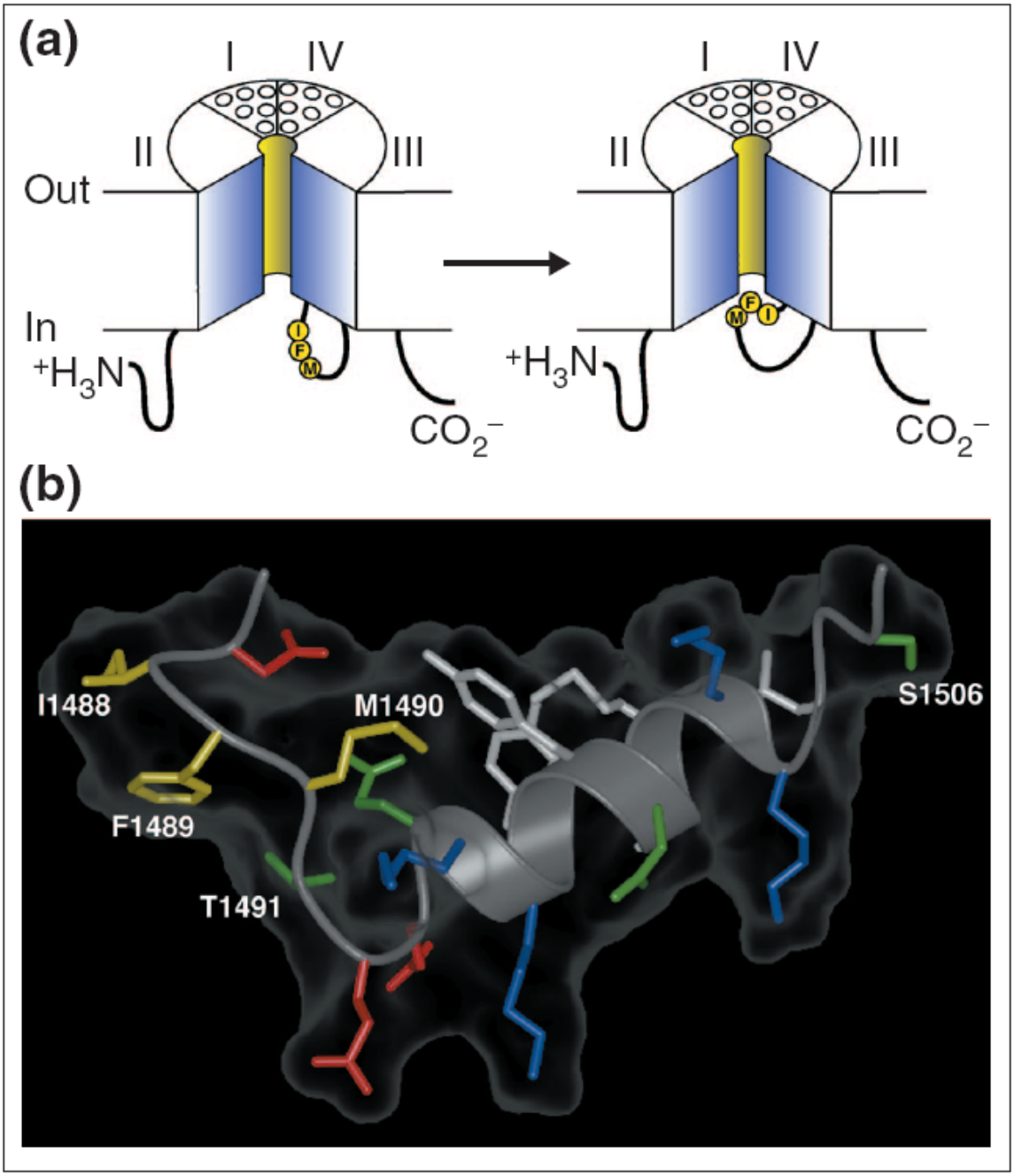


Figure 13 : Mécanismes d'inactivation des canaux sodiques (d'après Catterall, 2000).

a : Mécanisme d'inactivation par lequel la boucle intracellulaire reliant les domaines III à IV vient fermer le pore par sa face intracellulaire. b : Structure tridimensionnelle du segment central de la porte d'inactivation, déterminée par RMN (Rohl *et al.*, 1999). Les résidus I1488, F1489, M1490 et T1491 (motif IFMT) sont représentés (le résidu S1506 est un site de phosphorylation par les PKC).

En ce qui concerne l'inactivation lente, elle serait due à un réarrangement de la structure du pore avec un mécanisme similaire à celui observé lors de l'inactivation de type C chez les canaux potassiques (Liu *et al.*, 1996). C'est la partie externe du pore qui semble être impliquée dans le mécanisme d'inactivation lente. D'une part, les mutations réalisées au niveau des boucles P perturbent l'inactivation des canaux sodiques (Vilin *et al.*, 1999; Vilin *et al.*, 2001). D'autre part, les mutations réalisées sur l'anneau externe EEDD de charges négatives, et en particulier du résidu E403, modulent l'inactivation lente (Xiong *et al.*, 2003) et celles réalisées au niveau du motif DEKA pourraient stimuler l'entrée des canaux dans un état d'inactivation très lente (Hilber *et al.*, 2001).

Les sous-unités beta

Les sous-unités auxiliaires β sont des petites glycoprotéines (30 à 40 kDa) composées d'un seul segment transmembranaire, d'une petite chaîne carboxyterminale intracellulaire et d'un grand segment aminoterminal extracellulaire présentant un domaine Immunoglobulin-like. Ces sous-unités β sont associées, souvent par deux, à une sous-unité α de façon non-covalente ou covalente en fonction des différentes isoformes (Catterall, 1986b; Isom, 2001) (**Figure 14**).

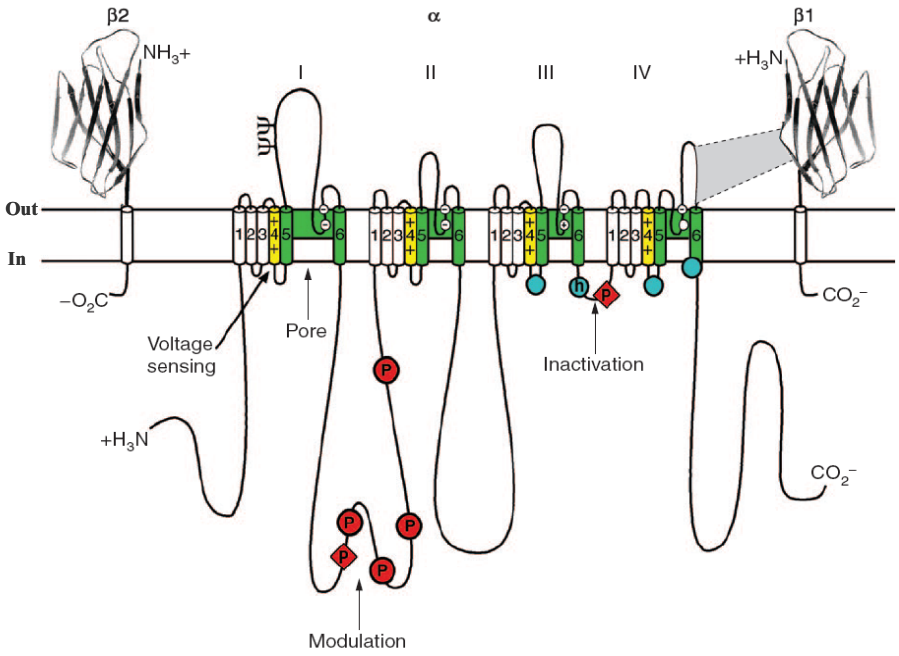


Figure 14 : Structure des canaux sodiques voltage-dépendants (tiré de Yu and Catterall, 2003)

Représentation schématique des sous-unités du canal sodique. La sous-unité α du $Na_V1.2$ est ici représentée avec les sous-unités β1 et β2 ; les domaines extracellulaires sont représentés avec leur structure de type immunoglobuline. Le site d'interaction entre les sous-unités α et β1 est aussi représenté.

Quatre gènes nommés SCN1B, SCN2B, SCN3B et SCN4B ont été identifiés comme codant pour les sous-unités β1, β2, β3, β4 respectivement (Catterall, 1992; Isom *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003). Ces gènes sont localisés sur les chromosomes 11 (SCN2B, SCN3B et SCN4B) et 19 (SCN1B). Il existe deux variants d'épissage de la sous-unité β1 : β1A et β1B. La sous-unité β1A est exprimée dans le cerveau embryonnaire ainsi que dans le cœur adulte de rat (Kazen-Gillespie *et al.*, 2000). Les sous-unités β1 et β3 présentent une homologie de séquences de l'ordre de 45% et les sous-unités β2 et β4 sont aussi assez proches puisqu'elles présentent une homologie de l'ordre de 35%. L'expression de ces différentes sous-unités varie en fonction des tissus et semble être régulée au cours du développement embryonnaire. Par exemple le profil d'expression de la sous-unité β1 au niveau du cœur varie au cours du développement, avec une augmentation dans les stades embryonnaires tardifs et dans la période néonatale, pour atteindre un niveau maximal dans le cœur adulte (Dominguez *et al.*, 2005). D'un point de vue structural, les sous-unités β1 et β3 interagissent avec la sous-unité α par des liaisons non-covalentes alors que les sous-unités β2 et β4 y sont reliées par des ponts disulfure. En ce qui concerne leurs fonctions, elles sont multiples : les sous-unités β modulent non seulement les propriétés électrophysiologiques, la transcription et l'expression à la membrane des sous-unités α des Na_v, mais elles agissent aussi en tant que molécules d'adhésion. Elles interagissent avec la matrice extracellulaire, régulent la migration et l'agrégation cellulaire et interagissent également avec le cytosquelette (Brackenbury and Isom, 2008; Isom, 2001).

De nombreuses revues traitant de la régulation des propriétés électrophysiologiques du Na_V par les sous-unités β ont été publiées (Adelman, 1995; Catterall, 1992, 2000; Goldin, 1993; Gurnett and Campbell, 1996; Isom *et al.*, 1994). C'est la sous-unité β1 qui a été la plus étudiée. En 1992, Isom et collaborateurs montraient que sa co-expression dans des ovocytes de Xénope avec les sous-unités α entraînait une augmentation de la taille du courant sodique au pic, accélérait son inactivation et déplaçait la voltage-dépendance de l'inactivation vers des potentiels de membrane hyperpolarisés (Isom *et al.*, 1992). Toutefois les effets de la sous-unité β1 sont très dépendants du système expérimental dans lequel ils sont étudiés, que ce soit les cellules de mammifères CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois), HEK (cellules de rein embryonnaire humain) ou les ovocytes de xénope (Isom *et al.*, 1995; Kazen-Gillespie *et al.*, 2000). Les différences observées pourraient être dues à un mécanisme de traduction des protéines chez les mammifères qui diffère de celui des ovocytes de xénope ou à une expression endogène de sous-unités β par les lignées cellulaires mammifères (Moran *et al.*,

2003). Les sous-unités β3 et β2 semblent intervenir beaucoup moins dans la régulation de l'inactivation que la sous unité β1 (Morgan *et al.*, 2000). Par ailleurs β3 est responsable de l'augmentation du courant sodique persistant (Qu *et al.*, 2001). La sous-unité β4, enfin, semble avoir un rôle antagoniste de β1, puisqu'elle favorise l'activation notamment des isoformes $Na_V1.2$ et $Na_V1.4$ (Aman *et al.*, 2009). Une première étude a montré qu'elle avait peu d'effet sur l'isoforme $Na_v1.5$ (Yu *et al.*, 2003). Cependant, lorsqu'elle est mutée, elle pourrait être impliquée dans un syndrome de QT-long congénital (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007). Cette sous-unité semble en outre être responsable des courants sodiques dits « résurgents » (Grieco *et al.*, 2005), dus à un phénomène de réactivation rapide, et se produisant lors d'une repolarisation après une dépolarisation membranaire à des potentiels positifs ; mais cette propriété n'est pas retrouvée dans des systèmes d'expression hétérologues (Chen *et al.*, 2008).

Nous avons vu que les sous-unités β possédaient un grand domaine extracellulaire de type immunoglobuline : c'est par ce domaine que se font les interactions avec la sous-unité α (McCormick *et al.*, 1999). En plus de la partie extracellulaire, la partie carboxyterminale intracellulaire de la sous-unité β1 semble aussi intervenir dans une association efficace avec la sous-unité α pour moduler son activité (Meadows *et al.*, 2001).

Toutefois l'effet des sous-unités β sur le Na_V ne se limite pas à la régulation des propriétés électrophysiologiques. Elles sont également impliquées dans le transport intracellulaire des sous-unités α ainsi que dans leur adressage à la membrane plasmique (Johnson and Bennett, 2006; Zimmer and Benndorf, 2002). Elles sont aussi capables de réguler la transcription des gènes de la sous-unité α, comme cela l'a été montré pour la sous-unité β2, après clivage du domaine C-terminal intracellulaire par la γ-secretase (Kim *et al.*, 2007). Comme d'autres protéines avec un domaine immunoglobuline, elles peuvent aussi servir de molécules d'adhésion avec la matrice extracellulaire ou avec d'autres cellules, et de protéines de liaison au cytosquelette (Malhotra *et al.*, 2002; Ratcliffe *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 1998). Ce domaine peut ainsi se lier par exemple à d'autres molécules de type CAM (Cell Adhesion Molecule) : NrCAM (β1), la neurofascine-186 (β1 et β2), et la contactine (β1) (McEwen *et al.*, 2004). La sous-unité β2 peut également se lier à des molécules extracellulaires comme la tenascine-C et la tenascine-R (Isom, 2002).

Ainsi, en tant que composants des complexes macromoléculaires que représentent les canaux sodiques dépendants du voltage, les sous-unités β interviennent dans la régulation de l'excitabilité cellulaire, certains aspects du développement et de la plasticité du système

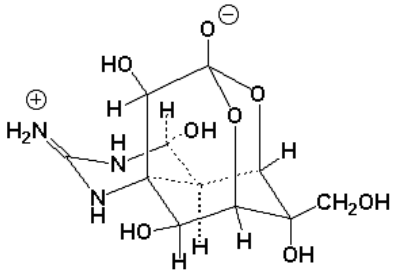
nerveux central, mais elles peuvent également jouer un rôle dans le processus métastatique de certains cancers (Chen *et al.*, 2004; Chioni *et al.*, 2009; Lopez-Santiago *et al.*, 2006).

2. Pharmacologie et régulation

a) Pharmacologie du NaV

La pharmacologie des canaux sodiques a fait l'objet de nombreuses revues qui permettent de récapituler les différents sites d'interaction, les mécanismes d'action et les effets de différentes molécules (Bosmans and Tytgat, 2007; Catterall *et al.*, 2005; Cestele and Catterall, 2000; Li and Tomaselli, 2004; Wang and Wang, 2003). Les Na_V sont la cible, d'une part de toxines naturelles retrouvées chez différentes espèces de scorpions, de serpents, d'araignées, de mollusques, d'anémones de mer, *etc*…., et de végétaux, mais également de nombreuses molécules thérapeutiques et d'agents anesthésiants, et sont sensibles à certains insecticides. Ces molécules interagissent avec différents sites de la sous-unité principale des Na_V : neuf sites récepteurs à des toxines et molécules pharmacologiques ont été décrits jusqu'à présent sur les canaux sodiques dépendants du voltage (Anger *et al.*, 2001) (**Tableau 2**). On peut regrouper les molécules selon leur mode d'action : il y a celles qui bloquent le pore, celles qui modulent l'ouverture par interaction avec des sites enchâssés dans la membrane, et celles qui modulent l'activité du canal en agissant sur des sites extracellulaires. Ces molécules peuvent en outre permettre de différencier les nombreuses isoformes de canaux sodiques entre elles et constituent des outils intéressants, très utilisés pour les études de type structure-fonction.

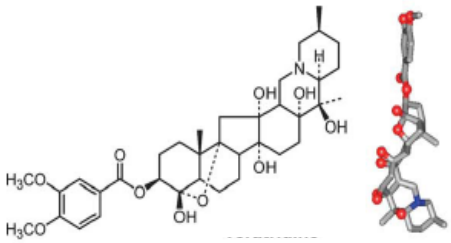
Au cours de cette thèse, nous avons principalement utilisé deux toxines : une qui bloque le pore, la tétrodotoxine (TTX), et l'autre qui permet de maintenir l'activation du canal, la vératridine.



La TTX est une molécule hétérocyclique avec un noyau guanidinium et un cycle pyrimidine. Elle est hydrophile et interagit avec le site récepteur 1 des canaux sodiques, en empêchant le passage des ions par encombrement stérique (Narahashi *et al.*, 1964). C'est un bloqueur très puissant et très sélectif des canaux sodiques. Elle entraîne un blocage rapide et réversible en presque totalité des courants sodiques dépendants du voltage. Elle est isolée des

tubes digestifs d'au moins 40 espèces de poissons globes de la famille des Tetraodontidae (*Tetraodon*, dont une espèce comestible est connue sous le nom de Fugu).

La vératridine quant à elle est un alcaloïde végétal qui provient de plantes appartenant à la famille des *Liliaceae*, elle est retrouvée dans les rhizomes de *Veratrum album* et dans les graines de *Schoenocaulon officinale*. Cette toxine pourrait se fixer



préférentiellement à l'état activé des canaux sodiques (interaction avec le segment transmembranaire IV-S6) et entraîner, en altérant le mouvement du détecteur de voltage adjacent, une activation persistante due au blocage de l'inactivation et au déplacement du seuil d'activation vers des potentiels plus négatifs (Cestele and Catterall, 2000; Wang and Wang, 2003). Elle pourrait également se fixer à l'intérieur du pore et créer de façon continue une gouttière hydrophile pour le passage des ions (Tikhonov and Zhorov, 2005).

Tableau 2 : Sites de liaison des toxines et insecticides (en italique) sur les canaux sodiques voltage-dépendants (modifié d'après Anger *et al.*, 2001).

Site	Toxines	Effet physiologique	Références
1	tétrodotoxine (TTX)	blocage de la perméabilité au sodium	(Kao and Fuhrman, 1963)
	saxitoxine (STX)		(Kao and Nishiyama, 1965)
	μ-conotoxine		(Cruz *et al.*, 1985)
2	batrachotoxine (BTX)	activation persistante	(Catterall, 1976)
	vératridine		(Ulbricht, 1969)
	aconitine		(Schmidt and Schmitt, 1974)
	grayanotoxin		(Narahashi and Seyama, 1974)
	N-alkylamides		(Ottea *et al.*, 1989)
3	toxines α de scorpion	ouverture prolongée du canal	(Jover *et al.*, 1980)
	toxine d'anémone de mer (ATXII)		(Beress *et al.*, 1975)
	δ-atracotoxine		(Little *et al.*, 1998)
4	toxines β de scorpion	déplacement de la courbe d'activation	(Adam and Weiss, 1959)
5	brevetoxines	déplacement de la courbe d'activation	(Baden *et al.*, 1984)
	ciguatoxines		(Bidard *et al.*, 1984)
6	δ-conotoxines	ouverture prolongée du canal	(Fainzilber *et al.*, 1994)
7	*DDT* et analogues	activation persistante	(Woolley, 1994)
	pyréthroïdes		(Lombet *et al.*, 1988)
8	toxines de cônes (conotoxines)	ouverture prolongée du canal	(Gonoi *et al.*, 1986)
			(Gonoi *et al.*, 1987)
9	anesthésiques locaux	blocage de la perméabilité au sodium	(Starmer *et al.*, 1984)
	anticonvulsants		(Kuo, 1998)
	dihydropyrazoles		(Salgado, 1992)

b) Régulation de l'activité du NaV

La régulation de l'activité du Na_V, comme nous l'avons vu avec les sous unités-β, peut consister en une modulation directe des propriétés électrophysiologiques du canal. Cette régulation peut aussi passer par des changements dans le niveau d'expression ainsi que dans l'adressage et la distribution du canal à la membrane plasmique, mais également sa dégradation. Les protéines qui interagissent avec le Na_V, de manière directe ou indirecte, et qui sont présentes dans le cytosol ou dans la matrice extracellulaire, vont avoir alors un rôle important, et peuvent être impliquées, lorsqu'elles sont déficientes, dans des canalopathies sodiques (Abriel, 2010; Herfst *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2009).

Si l'on prend l'exemple du $Na_V1.5$, peu de choses sont connues en ce qui concerne les mécanismes qui régulent la transcription de SCN5A. Il a toutefois été mis en évidence que l'administration chronique d'anti-arythmiques de classe I entraînait une augmentation du niveau d'expression des ARNm et de protéines fonctionnelles (Duff *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1997; Taouis *et al.*, 1991). Le taux de calcium intracellulaire semble également réguler le niveau d'ARNm du Na_V (Chiamvimonvat *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1992; Sherman and Catterall, 1984). En effet, l'utilisation d'un ionophore calcique pour augmenter le $[Ca^{2+}]_i$ peut entrainer une diminution jusqu'à cinq fois de l'expression du Na_V, alors que l'application d'un chélateur calcique a l'effet inverse. Par ailleurs il a été montré que l'existence de polymorphismes dans la région promotrice du SCN5A pouvait avoir un effet important sur l'expression des canaux sodiques *in vitro* (Bezzina *et al.*, 2006). Enfin, pour ce qui est de l'intervention de protéines régulatrices dans l'expression du Na_V, il a été montré dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale que les MAP kinases ERK1 et ERK2 étaient impliquées dans la régulation de l'expression de $Na_V1.7$ (Yanagita *et al.*, 2003).

L'adressage des canaux à la membrane plasmique constitue une autre voie de régulation des courants sodiques d'une cellule. La transition du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi est une étape importante de ce processus. Il existe des motifs de rétention dans le RE comme le motif di-lysine (KK) que l'on peut retrouver à l'extrémité C-terminale de nombreuses protéines, mais pas du Na_V cardiaque. En revanche une séquence RXR a été identifiée comme motif de rétention en C-terminal mais également au niveau d'autres domaines cytoplasmiques, et la boucle intracellulaire reliant les domaines I et II du Na_V1 .5 contient trois motifs RXR (Zerangue *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2002). Zhou et collaborateurs ont proposé que la phosphorylation du Na_V par la protéine kinase A (PKA) puisse supprimer

la rétention du canal dans le RE, sous la dépendance du motif RRR. Toutefois, le fait que la suppression d'un motif de rétention RxR entraînait une diminution du courant sodique de base, au lieu d'entrainer une augmentation, a remis en cause l'hypothèse de fonctionnement classique de ce motif de « rétention », et ils ont alors pensé que ce motif pouvait réguler le recrutement du Na_V au niveau des cavéoles, qui sont des domaines membranaires particuliers qui peuvent servir de compartiment de stockage. Le transport des canaux sodiques du RE vers le Golgi pourrait également dépendre de l'interaction avec des protéines d'échafaudage comme les syntrophines, via des motifs de liaison au domaine PDZ de ces protéines (Herfst *et al.*, 2004). En ce qui concerne les mécanismes régulant le transport des canaux du Golgi vers la membrane, ils sont encore mal connus, mais il est proposé qu'une des étapes limitantes de l'adressage du Na_V à la membrane soit plutôt le transport du RE au Golgi, le RE constituant le réservoir des canaux sodiques de la cellule (Zimmer *et al.*, 2002). Par ailleurs, Hallaq et collaborateurs ont conforté, en utilisant une technique de microscopie confocale sur cellules vivantes, l'hypothèse selon laquelle l'activation de la PKA pouvait entrainer une redistribution des canaux sodiques cardiaques, des stocks intracellulaires vers la membrane plasmique, soulignant par la même occasion l'importance de la régulation du transport intracellulaire dans la modulation des courants sodiques (Hallaq *et al.*, 2006).

La régulation du niveau d'expression des canaux sodiques à la membrane plasmique dépend aussi de l'internalisation et de la dégradation ou du recyclage des canaux. Un processus classique de dégradation dépendante du protéasome est l'ubiquitinylation des protéines qui contiennent une séquence signal pour l'ubiquitine (Abriel *et al.*, 2000; Rotin *et al.*, 2000). L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui peut se lier de manière covalente à des protéines cibles, en faisant intervenir des enzymes appelées Ubiquitine-ligases et qui appartiennent à la famille E3. Une fois ubiquitinylées, les protéines qui sont internalisées peuvent être dirigées vers le lysosome ou le protéasome, mais elles peuvent également être dé-ubiquitinylées par des protéases spécifiques et recyclées vers la membrane (Abriel and Staub, 2005; Hicke and Dunn, 2003). Les membres Nedd4 / Nedd4-like de la famille E3 Ubiquitine-ligases se fixent spécifiquement aux protéines possédant un domaine PY constitué de la séquence PPxY (Rotin and Kumar, 2009). De tels motifs PY sont retrouvés sur l'extrémité carboxyterminale de tous les canaux sodiques dépendants du voltage, à l'exception des isoformes $Na_V1.4$, 1.9 et Na_X (Fotia *et al.*, 2004; Rougier *et al.*, 2005). Les enzymes Nedd4 / Nedd4-like possèdent elles-mêmes 2 à 4 domaines WW qui interagissent avec les motifs PY (Staub and Rotin, 1996). Il a été montré, dans un modèle d'expression

(ovocytes de xénope), que le courant sodique dû au fonctionnement du $Na_V1.5$ était fortement diminué par l'ubiquitinylation dépendante de Nedd4 (qui est homologue à la protéine humaine Nedd4-2) (Abriel *et al.*, 2000). Par ailleurs, dans des cellules mammifères l'isoforme $Na_V1.5$ est ubiquitinylée par la ligase Nedd4-2, après qu'elle se soit fixée directement au motif PY du canal (van Bemmelen *et al.*, 2004). Ces résultats ont été confirmés et étendus aux autres isoformes contenant le motif PY (Fotia *et al.*, 2004; Rougier *et al.*, 2005). Plus récemment, un autre groupe a trouvé que l'inhibition du protéasome était liée à une augmentation de courant sodique et de l'expression de $Na_V1.5$ dans les cardiomyocytes de rats nouveau-nés (Kang *et al.*, 2009). L'ubiquitinylation représente ainsi un système de régulation important des canaux sodiques. La **figure 15** permet d'avoir un aperçu général des mécanismes de régulation de l'expression et du transport du Na_V dans les cellules cardiaques.

Des modifications post-traductionnelles apparaissent sur cette figure, et parmi elles, la glycosylation du Na_V. Même s'il ne s'agit pas véritablement d'un phénomène de régulation les sous-unités α des canaux sodiques sont très fortement glycosylées, et cette glycosylation semble avoir des effets importants sur l'activité des canaux. En effet elle contrôle le renouvellement des protéines et il a été montré que le blocage de la glycosylation était responsable d'une diminution de la densité de canaux sodiques à la membrane (Waechter *et al.*, 1983). Les chaînes de sucres liées au domaine extracellulaire (principalement des acides sialiques) par des N- ou O-glycosylations pourraient représenter 15 à 40% du poids moléculaire total des Na_V (Schmidt and Catterall, 1987). Ces acides sialiques peuvent être des régulateurs importants de l'ouverture des Na_V et il a été montré que la réduction des résidus acides sialiques ou la déglycosylation complète de différentes isoformes de Na_V induisaient un déplacement de la dépendance au voltage vers des potentiels plus dépolarisés (Bennett *et al.*, 1997) et une diminution de la conductance unitaire (Cronin *et al.*, 2005).

Enfin, on remarquera également que sur la figure 15A est indiqué un motif de liaison à l'ankyrine, au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines II et III. L'ankyrine-G, en particulier, interagit directement avec un motif de neuf acides aminés VPIAVAESD (Lemaillet *et al.*, 2003) et elle semble intervenir, non seulement dans l'ancrage au cytosquelette (Bennett and Baines, 2001), mais aussi dans le processus d'adressage des canaux sodiques (Lowe *et al.*, 2008; Mohler *et al.*, 2004).

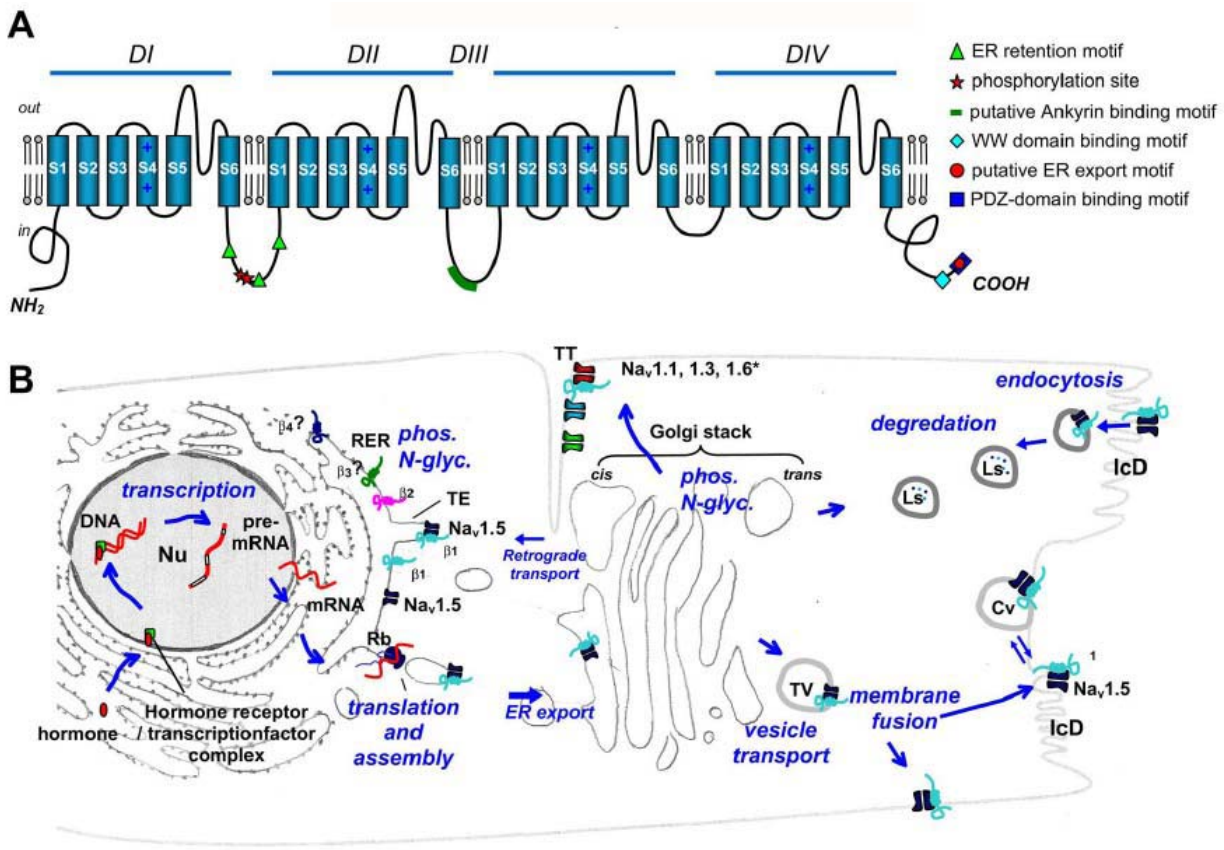


Figure 15 : Régulation de l'expression et du trafic intracellulaire du $Na_V1.5$ dans les cellules cardiaques (tiré de Herfst *et al.*, 2004). **A, Schéma de la sous-unité α du $Na_V1.5$ incluant des motifs de régulation, les sites de fixation de protéines accessoires et les sites de phosphorylation par les PKA. B, Schéma du transport du Na_V et des évènements majeurs de régulation. * les isoformes minoritaires de Na_V retrouvées dans le cœur sont aussi indiquées. Abréviations : Cv, cavéoles ; IcD, disques intercallaires ; Ls, lysosome ; N-glyc, N-glycosylation ; Nu, nucleus ; phos, phosphorylation ; RER, réticulum endoplasmique granuleux ; TE, éléments tubulaires ; TT, tubule transverse ; TV, vésicule de transport.**

Après avoir décrit les mécanismes régulant l'expression et le transport intracellulaire du Na_V, nous allons à présent nous intéresser aux protéines qui interagissent avec le Na_V et régulent ses propriétés électrophysiologiques.

Les canaux sodiques présentent une régulation importante par des messagers intracellulaires et possèdent en particulier de nombreux sites de phosphorylation sur des boucles intracellulaires, pour différentes protéines kinases que sont les PKA, PKC, PKG, certaines tyrosines kinases et même des MAP kinases. Ce sont les régulations par la PKA et la PKC qui sont les plus documentées (pour revue voir Cantrell and Catterall, 2001; Chahine *et al.*, 2005; Herfst *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2009). Toutefois, les différents effets des protéines

kinases sur les Na_V sont assez complexes étant donnés la multiplicité des sites pouvant être phosphorylés ainsi que le stade auquel se produisent les phosphorylations, menant alors à des changements de l'activité fonctionnelle et/ou de l'expression (Scheuer, 1994). Nous allons voir que des différences d'effets peuvent aussi être observées sur les courants sodiques en fonction du type d'isoforme de Na_v étudié, des voies de signalisation impliquées, des différents types cellulaires, des modèles d'expression ou espèces dans lesquels ils sont étudiés, *etc*… Les premières expériences qui ont permis de mettre en évidence une modulation fonctionnelle des canaux sodiques par phosphorylation dépendante de PKA ou PKC dans un contexte cellulaire ont été réalisées sur des canaux sodiques clonés exprimés dans des cellules de mammifères ou des ovocytes de xénope (Dascal and Lotan, 1991; Gershon *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Numann *et al.*, 1991; Sigel and Baur, 1988; Smith and Goldin, 1997).

La protéine kinase A (PKA), tout d'abord, fait partie de la grande famille des kinases à sérine/thréonine. Elle est activée par l'AMPc intracellulaire. Les effets observés sur les Na_V après son activation sont assez contradictoires puisque des augmentations aussi bien que des diminutions d'amplitude de courant ont été observées.

Les premières études biochimiques ont montré que les canaux sodiques du SNC pouvaient être phosphorylés par une protéine kinase dépendante de l'AMPc qui réduisait alors leur conductance ionique dans des synaptosomes cérébraux (Costa *et al.*, 1982; Costa and Catterall, 1984). Quatre sites de phosphorylation par la PKA ont alors été identifiés sur la boucle reliant les domaines I et II de la sous-unité α du $Na_V1.2$, sur les sérines en position 573, 610, 623 et 687 (Murphy *et al.*, 1993). Il a par la suite été montré que la phosphorylation de ces sites intracellulaires par la PKA réduisait l'amplitude du courant sodique de neurones de rat en culture (Li *et al.*, 1992) et de cellules de mammifères (Li *et al.*, 1992) ou d'ovocytes de xénope (Gershon *et al.*, 1992; Smith and Goldin, 1996) exprimant différentes isoformes nerveuses de canaux Na_V, sans altérer la dépendance au voltage de l'activation ou de l'inactivation. De la même manière, il a été montré dans les neurones de l'hippocampe et du striatum que l'action de la dopamine sur ses récepteurs de type D1 et D5, et l'activation consécutive de la protéine G_s et de la voie AMPc/PKA, résultait en une diminution de l'amplitude des courants sodiques, ainsi qu'en une diminution de la génération des potentiels d'action (Calabresi *et al.*, 1987; Cantrell *et al.*, 1997; Maurice *et al.*, 2001; Surmeier and Kitai, 1993). Ces effets sont dus à la phosphorylation d'un résidu sérine (S573) et nécessitent l'ancrage de la PKA à proximité des canaux sodiques, sur sa protéine d'ancrage AKAP-15 (A

Kinase Anchoring Protein-15 ; 15 kDa) (Cantrell *et al.*, 1997; Cantrell *et al.*, 1999b; Tibbs *et al.*, 1998).

Dans les cellules cardiaques, les effets qui ont été obtenus sur les courants sodiques sont assez controversés puisque des différences importantes concernant les variations d'amplitude du courant sodique ainsi que de la dépendance au voltage des canaux ont été observées, en fonction des cellules utilisées. Ainsi, des études réalisées sur des myocytes de rat et de lapin ou des ovocytes et des lignées cellulaires de mammifères exprimant le $Na_V1.5$, ont montré une augmentation du courant sodique suite à une stimulation par la PKA (Frohnwieser *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1992; Schreibmayer *et al.*, 1994), alors que celles réalisées sur des myocytes ventriculaires de cobaye ou de rats nouveaux-nés ont montré une inhibition du courant sodique cardiaque (Ono *et al.*, 1989; Schubert *et al.*, 1989).

D'autre part, une augmentation dose-dépendante de l'amplitude des courants TTX-R ainsi qu'un décalage vers des potentiels hyperpolarisés de la dépendance au voltage de l'activation dans les neurones sensitifs a été mise en évidence suite à l'activation de la PKA par des agents comme les prostaglandines E2 (England *et al.*, 1996; Gold *et al.*, 1998). Des effets similaires ont été observés avec l'utilisation d'activateurs de la PKA comme la forskoline, sur des ovocytes de xénope et des cellules COS-7 exprimant $Na_V1.5$ et $Na_V1.8$ (Fitzgerald *et al.*, 1999; Vijayaragavan *et al.*, 2004).

En ce qui concerne les PKC, ce sont aussi des sérine/thréonine kinases, qui se situent à l'intersection de nombreuses voies de transduction de signal et impliquées dans un grand nombre de réponses cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G ou de récepteurs aux facteurs de croissances (Dempsey *et al.*, 2000; Sabri and Steinberg, 2003). Les PKC, originellement décrites comme étant dépendantes du Ca^{2+} (Nishizuka *et al.*, 1978), ont été traditionnellement vues plutôt comme des enzymes sensibles aux lipides, activées par des voies de signalisations faisant intervenir par exemple les récepteurs aux facteurs de croissance, qui vont stimuler la phospholipase C (PLC), l'enzyme qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) pour générer le diacylglycérol (DAG), lié à la membrane et qui active la PKC, et l'inositol triphosphate (IP_3), qui permet la mobilisation du calcium intracellulaire. Beaucoup de PKC sont aussi activées par des agents pharmacologiques comme les esters de phorbol, et en particulier le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), qui permet d'ancrer les PKC aux membranes, dans leur conformation active. Selon le modèle classique d'activation des PKC, les réponses des PKC cellulaires résultent de

l'ensemble des actions individuelles des isoformes de PKC, qui sont coexprimées dans un type cellulaire particulier et localisées au niveau de compartiments subcellulaires distincts, à proximité de leurs substrats membranaires spécifiques (Steinberg, 2008). Il existe en effet une dizaine d'isoformes différentes, réparties en trois classes, en fonction de leur structure moléculaire et de leur mode d'activation (Newton, 2001). Il y a ainsi les PKC conventionnelles (cPKC) α, βI, βII et γ qui sont activées par le Ca^{2+} et le DAG ; les PKC nouvelles (nPKC) δ, ε, η et θ qui sont activées par le DAG mais sont indépendantes du Ca^{2+} ; et les PKC atypiques (aPKC) ζ et ι/λ qui sont indépendantes à la fois du DAG et du Ca^{2+}, mais qui, comme les autres classes, sont activées par la phosphatidylsérine (**Figure 16**). On comprendra alors que la composition en acides gras du DAG soit importante pour l'activation de la PKC, et en particulier que la composition en acides gras polyinsaturés puisse moduler l'activation des isoformes PKCα, δ et βI (Madani *et al.*, 2001). Enfin, certains considèrent qu'il existe une quatrième classe de PKC constituée par les PKC μ et ν (Hayashi *et al.*, 1999), mais d'autres les classent dans une famille bien distincte appelée protéine kinase D.

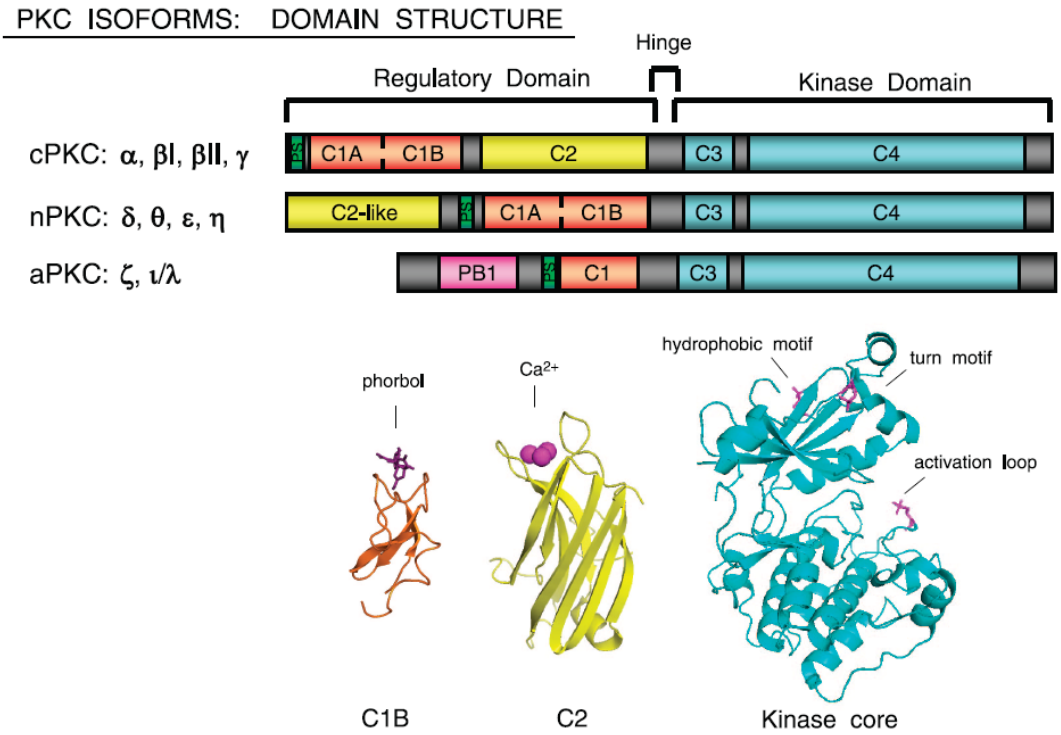


Figure 16 : Structure des domaines des différentes isoformes de PKC (tiré de Steinberg, 2008). **En haut : les PKC ont un domaine kinase conservé et des domaines régulateurs variables. Tous les domaines régulateurs ont un motif pseudosubstrat (PS) qui permet de maintenir l'enzyme dans sa conformation inactive. Les domaines C1 en tandem sont les détecteurs moléculaires du PMA/DAG pour les isoformes cPKC et nPKC alors que le domaine C1 des isoformes aPKC ne lie pas le DAG/PMA. Le domaine C2 fonctionne comme un module de liaison aux phospholipides dépendante du Ca^{2+} pour les isoformes cPKC. Le domaine C2 des isoformes nPKC ne lie pas le Ca^{2+} ; le domaine C2-like des PKC δ est un module d'interaction phosphotyrosine. En bas : représentation de la structure des domaines C1B, C2 et kinase des PKC.**

Les études menées sur la régulation du Na_V par les PKC ont principalement porté sur l'effet général des PKC et surtout sur les régulations induites par les cPKC et les nPKC, par l'utilisation de différents activateurs à spectre large du type PMA ou PDBu (phorbol 12, 13-dibutyrate). Les effets observés semblent être plus homogènes que ceux obtenus avec la PKA et d'une façon générale les PKC semblent être responsables d'une diminution des courants sodiques. Quelques études plus récentes mais peu nombreuses s'intéressent à l'implication d'isoformes particulières dans la régulation des canaux sodiques dépendants du voltage (Chen *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2001).

Ainsi, l'activation des PKC par les esters de phorbol entraîne une réduction importante de l'amplitude des courants sodiques et un ralentissement de l'inactivation (ainsi qu'un déplacement de l'inactivation dépendante du voltage vers des potentiels plus hyperpolarisés), et ce pour différentes isoformes de Na_V ($Na_V1.2$, $Na_V1.4$, $Na_V1.5$, $Na_V1.7$ et $Na_V1.8$) exprimées dans des ovocytes de xénope (Bendahhou *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1997; Schreibmayer *et al.*, 1991; Vijayaragavan *et al.*, 2004). En utilisant comme autre modèle d'expression des cellules de mammifères, les cellules CHO, des réductions similaires de l'amplitude des courants ont été observées. Le ralentissement de l'inactivation résulte de la phosphorylation d'une sérine (Ser1506) au niveau de la porte d'inactivation sur la boucle reliant les domaines III-IV, tandis que l'effet sur l'amplitude du courant est dû à la phosphorylation de sérines situées sur la boucle I-II (Ser554 et Ser573) (Cantrell *et al.*, 2002). L'activation de la PKC consécutive à la fixation d'acétylcholine sur son récepteur muscarinique entraîne également une réduction de l'amplitude des courants sodiques dans différents types cellulaires du tissu nerveux (Cantrell *et al.*, 1996; Mittmann and Alzheimer, 1998). Sur les neurones de l'hippocampe de souris, c'est la PKCε qui est responsable de cette diminution de l'amplitude de courant sodique (Chen *et al.*, 2005). En revanche, dans les neurones sensitifs des ganglions spinaux, qui expriment les canaux TTX-R $Na_V1.8$ et $Na_V1.9$, il a été rapporté une augmentation dose-dépendante de l'amplitude des courants sodiques par des activateurs de PKC (Gold *et al.*, 1996). Ceci pourrait être dû au fait que les deux types de canaux TTX-R peuvent être régulés différemment par les PKC (Amaya *et al.*, 2000), l'isoforme $Na_V1.8$ semblant être régulée par la PKCε (Vijayaragavan *et al.*, 2004).

Enfin, il a été montré que dans certains cas, la réduction maximale du courant sodique par la PKA était obtenue par l'activation simultanée de la PKC, qui va phosphoryler la sérine S1506 sur la boucle reliant les domaines III et IV (ainsi que les sérines S554 et S573 de la boucle reliant les domaines I et II) (Cantrell *et al.*, 1999a; Li *et al.*, 1993). Ainsi, la

phosphorylation de S1506 est supposée faciliter la phosphorylation de la boucle reliant DI et DII par la PKA, sur les résidus sur S573, S610, S623 et S687. L'implication de la sérine S573 dans ce phénomène soulève l'hypothèse d'une régulation du canal sur un seul site par deux kinases. En fait il a été montré que des potentiels hyperpolarisés (-110 mV) favorisaient la phosphorylation de $Na_V1.2$ par l'activation simultanée de la PKA et de la PKC, alors que pour des potentiels plus dépolarisés, la régulation par la PKA augmente et la nécessité d'avoir une stimulation par la PKC diminue progressivement jusqu'à disparaître complètement (Cantrell *et al.*, 2002). Enfin, Cantrell et collaborateurs ont également montré que la modulation maximale des canaux sodiques est obtenue par l'action simultanée des PKA et PKC et nécessite la phosphorylation de quatre sites distincts sur la boucle intracellulaire qui relie les domaines I et II : S554, S573, S576 et S687.

En plus des PKC et des PKA, d'autres protéines comme les phosphatases, la kinase Ca^{2+}-calmoduline dépendante, les récepteurs tyrosine-kinase dépendants des facteurs de croissance et les protéines kinases GMPc-dépendantes (PKG) modulent aussi les canaux sodiques voltage-dépendants (Aley *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1995; Deschenes *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 1999). Ainsi, les phosphatases comme la calcineurine, la phosphatase 1 et la phosphatase 2A ont un rôle important de régulation du Na_V. La calcineurine, qui est une phosphatase régulée par le Ca^{2+}, peut déphosphoryler les sérines S573 et S623 alors que la phosphatase 2A déphosphoryle les résidus S610 des canaux $Na_V1.2$ (Chen *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que les PKG (qui sont aussi des sérine/thréonine kinases), lorsqu'elles sont activées, par exemple par le monoxyde d'azote qui régule la guanylate cyclase, peuvent phosphoryler le Na_V et vont entraîner une réduction de l'amplitude du courant sodique (Ahmmed *et al.*, 2001). Dans les cellules PC12 (lignée cellulaire issue d'une tumeur de glande médullosurrénale de rat), l'activation de récepteurs de type tyrosine kinase à différents facteurs de croissance (EGF, PDGF, bFGF) entraîne une diminution de l'amplitude des courants sodiques nerveux et un déplacement de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Hilborn *et al.*, 1998).

Enfin, une autre protéine appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases a été décrite comme régulant le Na_V : la kinase Ca^{2+}-calmoduline dépendante II (CaMKII). Il a été montré que l'isoforme cardiaque CaMKIIδc pouvait être co-localisée et co-immunoprécipitée avec $Na_V1.5$ dans le cœur (Wagner *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2009), mais le site d'interaction n'a pas encore été identifié. Par ailleurs, la surexpression de CaMKIIδc dans des myocytes de lapin et dans des souris transgéniques induit un déplacement dépendant du Ca^{2+} de la courbe

d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés, ralentit la réactivation et augmente le courant sodique persistant (Abriel, 2010). Cette CaMKII est activée par la calmoduline (CaM), une protéine ubiquitaire dans les cellules de mammifères qui agit en tant que détecteur de Ca^{2+} intracellulaire (Chin and Means, 2000). Lorsqu'elle fixe le Ca^{2+}, la CaM peut aussi directement réguler des protéines comme les canaux ioniques (Pitt, 2007). Le domaine C-terminal de toutes les isoformes de Na_V possède un motif isoleucine-glutamine (IQ) qui est un motif de liaison à la CaM (Herzog *et al.*, 2003). Plusieurs groupes ont montré que la dépendance au voltage de l'inactivation était régulée par la CaM et la présence du motif IQ. Cependant, les effets rapportés peuvent présenter des différences en fonction des isoformes et des systèmes cellulaires utilisés (Herzog *et al.*, 2003; Motoike *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2002; Young and Caldwell, 2005). Il a par ailleurs été montré que le Ca^{2+} intracellulaire pouvait aussi réguler le courant sodique en se fixant directement à l'isoforme $Na_V1.5$, sur un motif de type "EF-hand" sur l'extrémité C-terminale de la protéine (Wingo *et al.*, 2004). Dans une étude plus récente, Casini et collaborateurs ont montré que l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire diminuait la conductance unitaire du $Na_V1.5$ (Casini *et al.*, 2009).

Nous avons vu précédemment que des protéines intracellulaires, dont certaines dites d'échafaudage, pouvaient réguler l'expression et le transport intracellulaire du Na_V (ankyrines, syntrophines, ubiquitine-ligases, etc…) ; d'autres comme les protéines 14-3-3 et le FHF1B interviennent dans la régulation des propriétés électrophysiologiques du Na_V. Les membres de la famille 14-3-3 sont des protéines cytosoliques dimériques, exprimées dans toutes les cellules eucaryotes, et qui sont régulatrices d'une multitude de protéines comme les kinases, les phosphatases, les récepteurs transmembranaires, *etc*… (Morrison, 2009). Il a été démontré assez récemment que la protéine 14-3-3η interagissait avec la partie N-terminale de la boucle intracellulaire reliant les domaines I et II du $Na_V1.5$ (Allouis *et al.*, 2006). De plus, 14-3-3 et $Na_V1.5$ semblent être co-localisés au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes. Lorsqu'ils sont tous les deux co-exprimés dans des cellules COS, on observe un décalage de la courbe d'inactivation du Na_V vers des potentiels hyperpolarisés et un retard dans la réactivation, ce qui démontre la capacité des protéines 14-3-3 à modifier les propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques. En ce qui concerne FHF1B (Fibroblast growth factor homologous factor 1B), c'est une protéine qui appartient à la famille des facteurs de croissance fibroblastiques. Des études ont montré que ce facteur pouvait se fixer directement sur l'extrémité carboxyterminale des isoformes $Na_V1.9$ (Liu *et al.*, 2001) et $Na_V1.5$ (Liu *et al.*, 2003). L'expression de $Na_V1.5$ dans des cellules HEK-293 a montré que le facteur FHF1B

était responsable d'un déplacement de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés (Liu *et al.*, 2003).

En résumé, les canaux sodiques peuvent interagir avec des molécules de la matrice extracellulaire, mais aussi avec des protéines du cytosquelette, par l'intermédiaire des sous-unités auxiliaires β, ou directement par des sites d'interaction situés sur des boucles intracellulaires. Toutes ces interactions interviennent alors dans la régulation des courants sodiques des cellules. La **figure 17** permet d'en avoir un aperçu général.

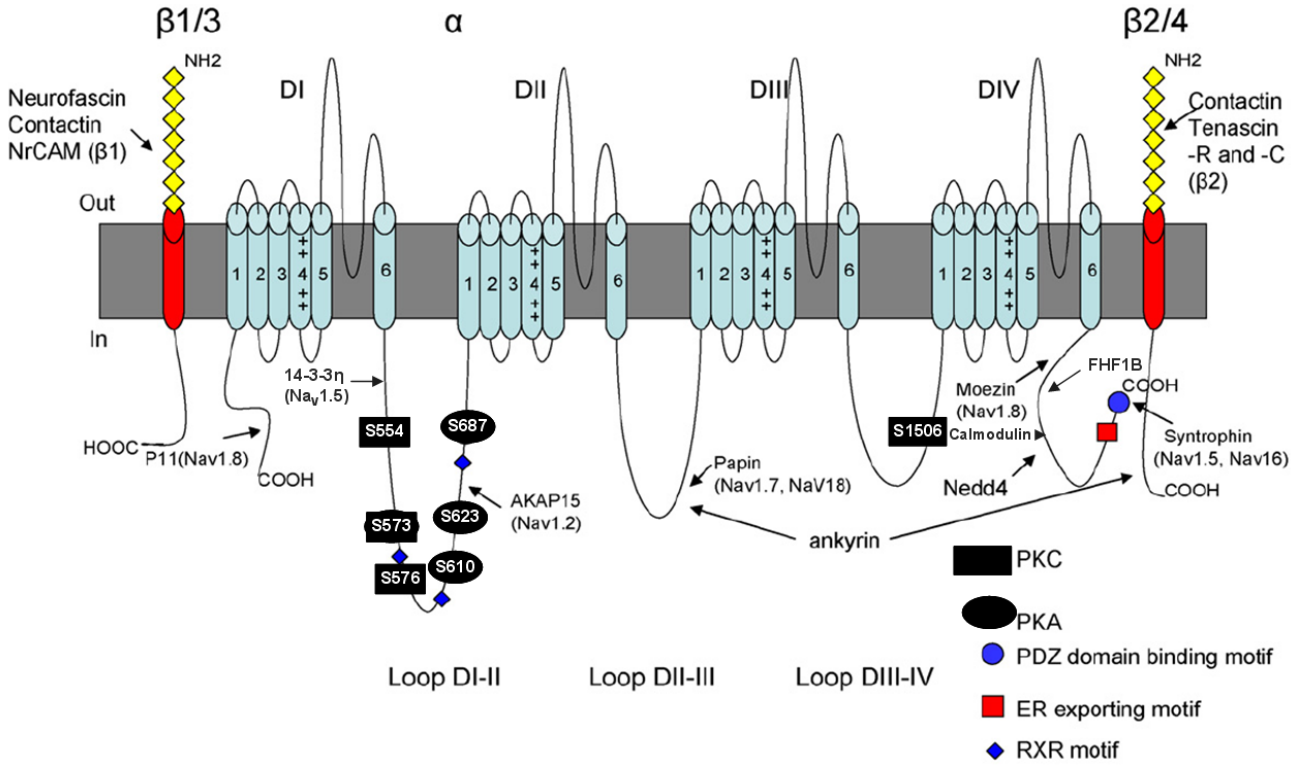


Figure 17 : Schéma représentant les différentes sous-unités du Na_V ainsi que les sites de liaison des protéines régulatrices (modifié d'après Abriel, 2010; Chahine *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2009). **Les protéines régulatrices sont indiquées ainsi que leurs sites d'interaction ; les spécificités relatives à certaines isoformes sont indiquées lorsque c'est le cas. Les zones d'interaction avec d'autres protéines comme la protéine p11, la papine ou la moezine ont été ajoutées ; ces protéines sont principalement impliquées dans le transport intracellulaire et l'adressage du Na_V.**

B. Canaux sodiques voltage-dépendants et cancer

Les canaux Na_V, dont le rôle dans l'excitabilité cellulaire est désormais bien décrit, sont retrouvés dans certains tissus épithéliaux cancéreux (lignées cellulaires, biopsies). Ils sont absents du tissu sain et ne semblent pas conférer d'excitabilité aux cellules dans lesquels ils sont anormalement exprimés. Ces canaux semblent intervenir dans le caractère hautement invasif des cellules cancéreuses, mais les mécanismes sont encore mal connus. Un des objectifs de cette thèse a précisément consisté à déterminer par quels mécanismes les canaux sodiques $Na_V1.5$ sont impliqués dans l'invasivité de la lignée de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. La revue suivante nous permet de dresser un état des lieux des connaissances concernant l'implication fonctionnelle des canaux sodiques voltage-dépendants ainsi que leurs rôles biologiques, dans différents types de cancers d'origine épithéliale et de leucémies.

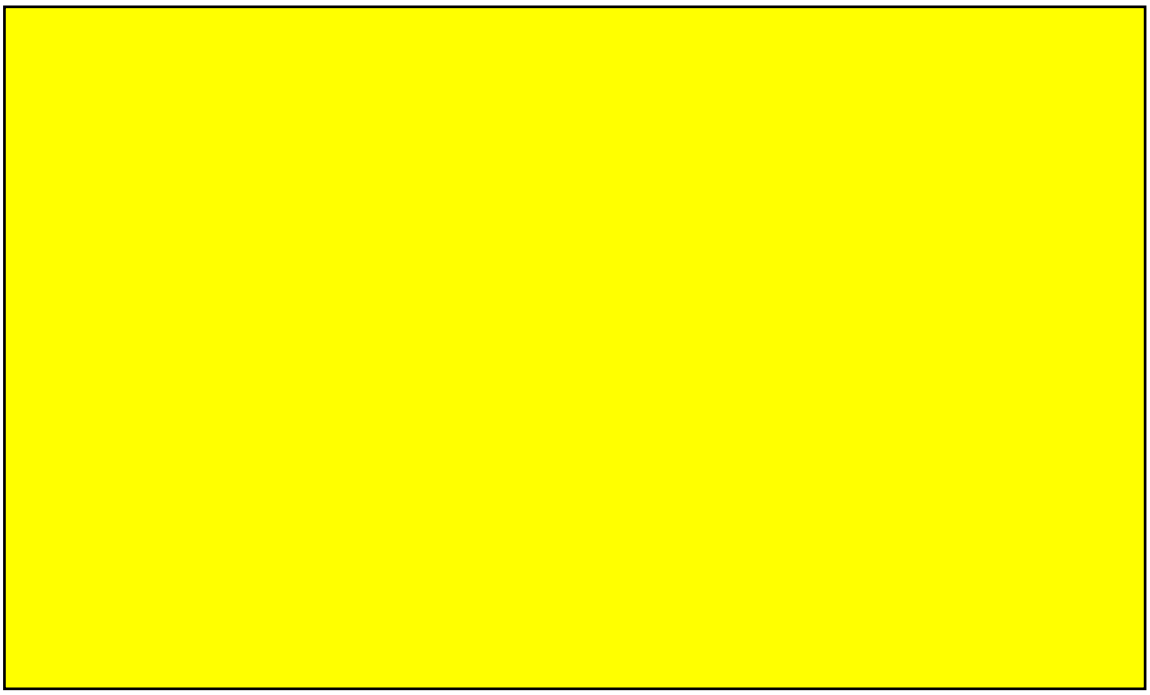
Voltage-Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy?

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.



III. Protéases, cancer et microenvironement tumoral

La progression des tumeurs primaires comme celle des métastases s'accompagne d'une protéolyse locale, permettant leur expansion spatiale (Liotta and Kohn, 2001). La cascade métastatique implique une série d'étapes qui incluent l'échappement des cellules du site de la tumeur primaire dans la circulation sanguine ou lymphatique et l'extravasation des cellules au niveau de sites secondaires (Gupta and Massague, 2006; Pantel and Brakenhoff, 2004). La première étape du processus correspond à l'invasion du tissu environnant par les cellules tumorales, et résulte de l'altération des interactions cellule-cellule, des changements dans l'ancrage au stroma et des modifications de la matrice extracellulaire (MEC). La protéolyse joue un rôle crucial dans cette étape initiale de l'invasion, à travers le clivage de protéines impliquées dans l'adhésion aux cellules voisines, comme la cadhérine E, permettant alors à une cellule de quitter la masse tumorale d'origine et de migrer. De plus, l'invasion peut être favorisée par la dégradation directe des composants de la MEC, créant ainsi un chemin pour les cellules cancéreuses, leur facilitant l'accès à la circulation. Les protéases vont ensuite jouer un rôle dans la dégradation de la membrane basale et permettre aux cellules en migration d'entrer dans les vaisseaux. Lorsqu'elles vont arriver au site secondaire, les cellules vont devoir sortir des vaisseaux et proliférer. La protéolyse va alors permettre le remodelage du tissu à travers le clivage des composants de la MEC qui, d'une part, facilite l'expansion de la tumeur secondaire, mais stimule également la croissance de la tumeur, l'invasion et l'angiogenèse, par la libération de facteurs de croissance qui se trouvent dans la matrice environnante. Plusieurs familles de protéases sont impliquées dans la progression tumorale : les métalloprotéases (les MMP (métalloprotéases matricielles solubles et membranaires), les ADAM (adamalysin-related disintegrin and metalloproteinases), ou les protéases de type BMP1 (bone morphogenetic protein-1)), les sérine-protéases, les cystéine- et aspartyl-protéases lysosomales (Del Rosso *et al.*, 2002; Egeblad and Werb, 2002; Turk *et al.*, 2004). Jusqu'à ces dernières années, la plus grande partie des études dans le domaine de la protéolyse et du cancer a principalement porté sur l'implication des MMP, une famille de 23 endopeptidades qui a été impliquée dans plusieurs aspects de la progression tumorale, y compris l'invasion et les métastases (Egeblad and Werb, 2002; Overall and Kleifeld, 2006). Cependant, comme l'explique Boris Turk dans une revue parue en 2006, le développement

d'inhibiteurs de MMP pour combattre le cancer s'est avéré être un échec (Turk, 2006). En effet, les MMP ayant été les premières protéases cibles impliquées dans le cancer, plusieurs inhibiteurs, d'une manière générale divisés en 2 groupes majeurs, les hydroxamates et les non-hydroxamates, ont été développés, mais les essais cliniques n'ont pas été un succès, du fait des effets secondaires importants ou de l'absence de bénéfice clinique majeur (Coussens *et al.*, 2002). L'uPA (urokinase plasminogen activator), qui appartient aux protéases à sérine, a également été associé à la dégradation de la MEC dans le cancer, en particulier par l'activation de cascades protéolytiques (Laufs *et al.*, 2006). En comparaison, la contribution des protéases à cystéines, comme les cathepsines, dans le cancer est moins bien connue. Ces dernières années, plusieurs revues ont décrit leur implication dans des processus tumorigéniques *in vivo* faisant intervenir la protéolyse, à savoir l'angiogenèse, l'invasion et les métastases (Gocheva *et al.*, 2006; Joyce *et al.*, 2004; Joyce and Hanahan, 2004; Vasiljeva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), et il est maintenant admis que les cathepsines à cystéine jouent un rôle très important dans la progression tumorale ; c'est à cette classe d'enzymes que nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cour de notre étude.

A. Cathepsines à cystéine et cancer

Les cathepsines à cystéine humaines forment un groupe de 11 protéases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X) qui ont une activité enzymatique de type papaïne (famille C1, clan CA). Ce sont principalement des endopeptidases intracellulaires localisées dans les vésicules endolysosomales où leur activité est optimale en raison de l'acidité du milieu (Brix *et al.*, 2008; Lecaille *et al.*, 2008). Elles exercent également une activité dans l'environnement péricellulaire vers lequel elles sont secrétées. Elles agissent alors sous forme soluble ou liée à des récepteurs membranaires. Les cathepsines B, H et L sont très largement exprimées dans l'organisme alors que les cathepsines F, S et V sont plus spécifiques de certains tissus ou cellules (**Tableau 3**). La cathepsine K, détectée à l'origine dans les ostéoclastes et les cellules ovariennes, est maintenant retrouvée dans la plupart des cellules épithéliales, notamment thyroïdiennes et pulmonaires (Buhling *et al.*, 1999).

Les cathepsines humaines, sous leur forme mature, montrent une grande similarité de séquence et de repliement (Turk *et al.*, 1998). Elles ont pour la plupart une masse moléculaire comprise entre 20 et 35 kDa (Turk *et al.*, 1997). Elles possèdent une structure à deux

domaines avec à leur interface un site catalytique en forme de V, au fond duquel se situent les résidus essentiels à l'activité enzymatique : Cys25, His159 et Asn 175 (numérotation de la papaïne). L'un des domaines (L ou left) est composé d'hélices α et l'autre (R ou right) s'organise autour d'une structure en tonneau β (McGrath, 1999) (**Figure 18**).

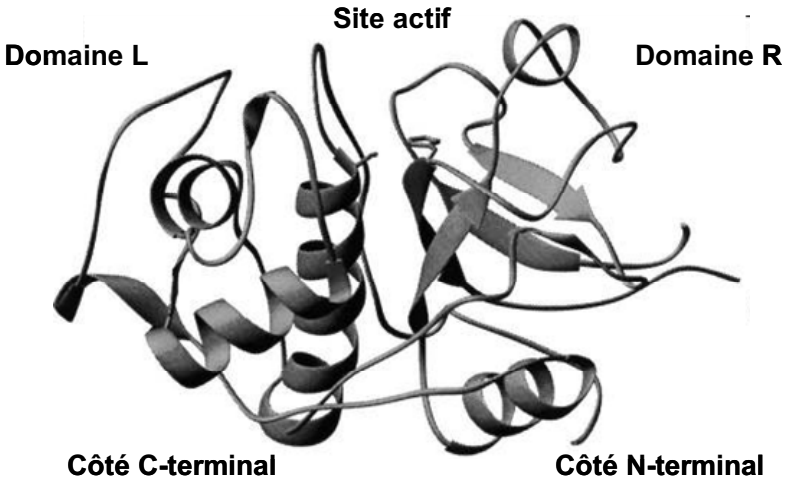


Figure 18 : Structure tridimensionnelle des cathepsines : exemple de la cathepsine L (modifié d'après Turk *et al.*, 2001).

Les cathepsines sont pour leur grande majorité des endopeptidases, c'est à dire qu'elles réalisent le clivage protéique à l'intérieur de la chaîne peptidique. Il existe cependant quelques exopeptidases, qui clivent du côté carboxy- ou aminoterminal. Ainsi la cathepsine B est à la fois une endopeptidase et une carboxydipeptidase (Mort *et al.*, 1998) ; la cathepsine X est une carboxy-mono et dipeptidase (Klemencic *et al.*, 2000) ; la cathepsine H est une aminopeptidase ; la cathepsine C une aminodipeptidase (Turk *et al.*, 2002).

La majorité des cathepsines sont synthétisées sous la forme d'une pré-procathepsine. L'activation du zymogène se fait via le clivage du propeptide en position N-terminale, par d'autres protéases, ou par auto-catalyse (Mohamed and Sloane, 2006; Turk *et al.*, 2000). Comme toutes les enzymes, l'activité des cathepsines dépend de la température et du pH. A la différence des sérine-protéases, dont l'activité est maximale pour des pH alcalins de l'ordre de pH 8, les protéases à cystéine présentent une activité maximale pour des pH acides compris entre 5 et 6, ce qui autorise une pleine fonctionnalité dans le compartiment lysosomal (Barrett and Kirschke, 1981). En effet, une fois maturées, les cathepsines ont un énorme potentiel d'activité puisque leur concentration à l'intérieur des lysosomes peut facilement excéder 1

mM (Xing *et al.*, 1998). Pour des pH neutres ou alcalins, la majorité des cathepsines s'inactivent très rapidement. Il s'agit très certainement d'un mécanisme de protection face aux libérations accidentelles de ces enzymes du lysosome dans le cytosol (Turk *et al.*, 1993). Seule la cathepsine S possède une résistance relative aux pH alcalins (Kirschke *et al.*, 1989).

Les cathepsines interviennent dans un grand nombre de fonctions physiologiques générales (**Tableau 3**), comme la dégradation des protéines intracellulaires ou encore le recyclage des protéines au sein des compartiments endosomaux et lysosomaux (cathepsines B, L, K et H). D'autres fonctions plus spécialisées sont exercées par certaines cathepsines comme la présentation de l'antigène aux molécules de classe II du CMH (cathepsines B, L et S), le remodelage des tissus osseux (cathepsine K), la différentiation des kératinocytes et le cycle folliculaire capillaire (cathepsine L), la reproduction (cathepsine L) et l'apoptose (cathepsines C et B) (Mohamed and Sloane, 2006). Elles présentent une activité protéolytique vis-à-vis des constituants majeurs de la matrice extracellulaire, dont le collagène et l'élastine, et de la membrane basale. Les cathepsines participent ainsi à divers processus pathologiques incluant la progression tumorale, avec notamment l'angiogenèse et l'invasion, l'ostéoporose ou encore la polyarthrite rhumatoïde.

De manière générale, l'expression et l'activité des cathepsines sont augmentées dans des conditions néoplasiques et ces protéases peuvent alors jouer un rôle dans différents processus favorisant la progression tumorale. Dans les carcinomes *in situ*, il a été montré que les cathepsines étaient sécrétées vers le pôle basal des cellules contribuant ainsi à la dégradation de la MEC (Rozhin *et al.*, 1994). Une diffusion régulière des protéases est également possible en raison de leur localisation dans des cavéoles (Mohamed and Sloane, 2006). Les cathepsines B et L surtout, mais également la cathepsine H, ont été parmi les plus étudiées, et leur augmentation, observée dans différents cancers, est généralement associée à un mauvais pronostic (Palermo and Joyce, 2008). On observe également une augmentation spécifique de certains types cellulaires, des cathepsines S et K, par exemple dans les cancers du sein, des poumons et de la prostate (Jedeszko and Sloane, 2004).

En plus de leur surexpression et/ou de leur activité accrue, certaines cathepsines peuvent être redistribuées différemment dans la cellule lors de la progression tumorale. En effet, dans la cellule normale, les cathepsines sont localisées principalement dans le lysosome, alors que dans la cellule cancéreuse, elles peuvent être exprimées à la surface cellulaire et sécrétées dans le milieu extracellulaire. La présence de pompes ou d'échangeurs générant un

pH péricellulaire acide a permis de démontrer que ces protéases restaient actives et stables même après leur sécrétion (Punturieri *et al.*, 2000). Cette localisation extracellulaire leur permet notamment d'interagir avec la MEC et d'influencer la progression néoplasique (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Expression tissulaire et fonctions des cathepsines à cystéine humaines (modifié d'après Brix *et al.*, 2008).

Name	Cleavage specificity	Tissue expression	Function	pH
Cathepsin B	Endopeptidase; peptidyl-dipeptidase	Ubiquitous	Lysosomal, extracellular; proteolytic processing of APP tumor invasion and metastasis	pH 4–6 (optimal), stable to pH 7
Cathepsin C	Peptidyl-dipeptidase, tripeptidyl-peptidase; endopeptidase	Ubiquitous	Lysosomal; activates granulocyte serine proteases, factor XIII neuraminidases	pH 6 (optimal), pH 4–7.5 (stable)
Cathepsin F	Endopeptidase	Heart, skeletal muscle, brain, testis, ovary	Lysosomal; role in tumor invasion and metastasis	pH 5.2–6.8 (optimal), pH 4.5–7.2 (stable)
Cathepsin H	Endopeptidase, aminopeptidase	Brain, kidney, liver; inflamed tonsil	Lysosomal; invariant chain (Ii) degradation	pH 6.8 (optimal), pH 5–8 (stable)
Cathepsin K	Endopeptidase	Predominantly in bone (osteoclasts); present in most epithelial tissues	Lysosomal, extracellular; osteoclastic bone resorption; fibrinogen and ECM degradation	pH 6 (optimal), pH 4–8 (stable)
Cathepsin L	Endopeptidase	Ubiquitous	Lysosomal, extracellular, nuclear (truncated); antigen presentation (AP), Ii degradation, cell cycle regulation	pH 6 (optimal), pH 4–7 (stable) varying
Cathepsin O	Endopeptidase (pending)	Widely expressed	Lysosomal; protein turnover (pending)	
Cathepsin S	Endopeptidase	Alveolar macrophages, spleen, testis, epithelial cells; CD4+ T-cells	Lysosomal, extracellular; Ii degradation, artherogenesis, AP, angiogenesis, elastinolytic activity	pH 6 (optimal), pH 4.5–8 (stable)
Cathepsin V	Endopeptidase	Predominantly in thymus, testis; present in brain, corneal epithelium, skin	Lysosomal (potential); AP, Ii degradation	pH 5.7 (optimal), pH ≤4 to ≥7.2 (stable)
Cathepsin W	Pending	Spleen, natural killer and cytotoxic T-cells	Immune response, regulation of T-cell cytotoxic activity	
Cathepsin X	Carboxymono-peptidase, carboxydipeptidase	Widely expressed; ubiquitously in primary tumors and cancer cell lines	Lysosomal; non-proteolytic in cell adhesion	

Par ailleurs, il a été décrit que les niveaux d'inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine (stéfine A, cystatine C, kininogène) étaient diminués dans le tissu cancéreux mammaire, comparé au tissu normal, ce qui peut expliquer l'augmentation d'activité des cathepsines dans les tumeurs mammaires (Jedeszko and Sloane, 2004). Les inhibiteurs endogènes spécifiques des cathepsines qui ont été décrits appartiennent à une superfamille de plus de 25 membres, les cystatines. Cette superfamille d'inhibiteurs regroupe chez l'homme

des cystatines, des stéfines, des latéxines, des fétuines et des kininogènes. Ils sont pour la plupart sécrétés, à l'exception des stéfines qui sont cytoplasmiques (Turk and Bode, 1991), et peuvent présenter une plus ou moins grande spécificité pour les différentes cathepsines. Les stéfines et cystatines possèdent un unique domaine cystatine, les latéxines et fétuines en ont deux et les kininogènes en ont trois.

En plus de ce groupe, d'autres inhibiteurs spécifiques ont été décrits, comme les thyropines ou les serpines (Mohamed and Sloane, 2006; Schick *et al.*, 1998) ou le fragment de la chaîne invariable p41 associé au CMH de classe II, qui est un inhibiteur spécifique de la cathepsine L (Guncar *et al.*, 1999).

B. pH extracellulaire et digestion de la MEC

Des modèles d'étude du métabolisme tumoral, *in vitro* et *in vivo*, ont démontré un rôle direct de l'acidification extracellulaire dans la digestion et le remodelage de la MEC ainsi que dans le déclenchement de la mort cellulaire dans le tissu normal environnant (Gatenby *et al.*, 2006; Gatenby *et al.*, 2007; Mareel and Leroy, 2003). De plus, le remodelage de la MEC est accéléré par un faible pH, qui facilite l'action de protéases acides qui sont sécrétées par la cellule tumorale, et dont l'action est aussi de dégrader les glycosaminoglycanes (Vlodavsky *et al.*, 1999). Le faible pH du microenvironnement favorise ainsi un environnement protéolytique autour de la tumeur, qui optimise l'activité de l'uPA (Kindzelskii *et al.*, 2004), de la cathepsine D (Tedone *et al.*, 1997), des cathepsines notamment B et L (Mohamed and Sloane, 2006), mais aussi des cascades protéolytiques qui au final transforment les pro-MMP en MMP actives (Koblinski *et al.*, 2000). Les cathepsines B et L sont également impliquées dans la conversion de la pro-cathepsine D en forme mature (Liaudet-Coopman *et al.*, 2006). Il a été démontré que par un phénomène de rétrocontrôle positif, un faible pH pouvait stimuler la libération de cathepsines B et L (Bourguignon *et al.*, 2004; Mohamed and Sloane, 2006; Rozhin *et al.*, 1994) et de MMP-9 (Kato *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2007). Ceci pourrait se produire par l'augmentation directe du volume cellulaire lysosomal et la stimulation de la migration des lysosomes jusqu'à la membrane de la cellule (Glunde *et al.*, 2003; Mohamed and Sloane, 2006). Plusieurs études ont permis d'attribuer un rôle important à l'échangeur sodium-proton NHE1 dans cette régulation. D'une part, l'augmentation du pH extracellulaire, provoquée par l'incubation des cellules avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases ou l'inhibition du NHE1 par le cariporide (HOE 642) ou l'EIPA (Cardone *et al.*, 2005; Stock and

Schwab, 2006), entraîne une diminution de la capacité d'invasion des cellules tumorales. D'autre part, dans les cellules cancéreuses mammaires, l'inhibition directe de l'activité du NHE1 ou de l'acidification extracellulaire bloque l'augmentation de maturation et d'activité des cathepsines B (Bourguignon *et al.*, 2004). Enfin, la transfection stable d'un NHE1 déficient diminue l'expression et l'activité des MMP-9 (Putney and Barber, 2004).

Ainsi, l'environnement tumoral extracellulaire est plus acide que l'environnement intracellulaire et ce phénomène relève de la capacité des cellules tumorales à sécréter des protons. Cette capacité semble augmenter avec l'agressivité des tumeurs (Montcourrier *et al.*, 1997; Parkins *et al.*, 1997). Ce phénomène serait directement lié au métabolisme des cellules cancéreuses. En effet, il y'a plus de quatre-vingts ans, le Prix Nobel Otto Warburg a montré que les cellules cancéreuses possèdaient principalement un métabolisme glycolitique, et cela même en condition de normoxie (Warburg *et al.*, 1924). La plupart des tumeurs se développant cependant dans des conditions d'hypoxie, ces changements métaboliques qui se produisent au cours de la progression cancéreuse seraient principalement dus à l'activité du complexe HIF-1 (hypoxia-inducible complex-1), ainsi qu'à l'activation d'oncogènes (Hsu and Sabatini, 2008; Pouyssegur *et al.*, 2006). Ce phénomène connu sous le nom d'effet Warburg serait à l'origine du développement de l'environement cellulaire acide en conséquence de la production élevée d'acide lactique par la glycolyse. Afin d'éviter une acidification intracellulaire, les cellules doivent être capables d'expulser les protons vers le milieu extracellulaire (Huber *et al.*, 2010). Cette sécrétion de protons dépend alors du pouvoir tampon des cellules et des échangeurs membranaires comme le NHE1 que nous venons d'évoquer, mais aussi des échangeurs HCO_3^-/Cl^- Na^+-indépendants et Na^+ dépendants, ainsi que du cotransporteur H^+/lactate, connu sous le nom de MCT (monocarboxylate transporter) (Madshus, 1988). Une autre famille de protéines, les anhydrases carboniques (CAs), contribue à l'alcalinisation cellulaire en catalysant l'hydratation réversible du dioxyde de carbone produit par les cellules en protons et bicarbonates (Chiche *et al.*, 2009; Swietach *et al.*, 2007). L'expression en particulier des isoformes CA IX et CA XII, associées à la membrane plasmique, est considérablement augmentée en conditions hypoxiques, et ces deux isoformes sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du pH et dans le développement tumoral (Chiche *et al.*, 2010). Les H^+-ATPases vacuolaires (ou V-ATPases) qui, contrairement à ce que peut faire croire leur nom, ne sont pas uniquement retrouvées dans les vacuoles, participent également au transport des protons à travers la membrane plasmique de certains types de cellules cancéreuses et sont connues comme étant très fortement exprimées dans certaines lignées cellulaires et certains tissus cancéreux (Martinez-Zaguilan *et al.*, 1999;

Philippe *et al.*, 2002; Sennoune *et al.*, 2004). Récemment, certaines isoformes de V-ATPases ont été impliquées dans la régulation du pH de cellules cancéreuses mammaires et pourraient ainsi favoriser l'invasivité de ces cellules en contribuant à l'acidification locale de l'environnement extracellulaire (c'est-à-dire l'espace entre la surface cellulaire et la MEC) nécessaire à l'activation des protéases sécrétées, comme les cathepsines qui nécessitent un environnement acide pour une activité optimale (Hinton *et al.*, 2009).

IV. Acides gras et cancer

L'alimentation intervient à différents niveaux dans le déroulement de la maladie cancéreuse : on peut s'en apercevoir en évaluant le risque de développer la maladie (Doll, 1992) et en étudiant son évolution à partir de l'exérèse de la tumeur primaire et la mise en place du traitement (Chajes *et al.*, 2003; Lippman and Hong, 2002). En effet, une modification adéquate des habitudes alimentaires permettrait d'éviter la moitié des décès par cancer du sein (Willett, 1995). Parmi les composés pouvant moduler le risque de cancer du sein figurent les lipides alimentaires, dont les effets observés peuvent être en faveur d'une augmentation ou d'une diminution du risque. Ainsi, si un régime riche en graisses saturées a des effets promoteurs sur le cancer du sein, il a été montré que les acides gras poly-insaturés de la série n-3 (AGPI n-3), n'avaient pas d'une part cet effet promoteur, et pourraient au contraire s'avérer protecteurs (Favero *et al.*, 1998; Maillard *et al.*, 2002). Nous nous proposons donc dans un premier temps de rappeler quelques généralités sur les acides gras puis d'analyser les données de la littérature concernant les effets des AGPI n-3 sur le cancer du sein, un sujet qui fait encore débat aujourd'hui ; enfin nous nous intéresserons aux différentes cibles potentielles de ces acides gras ainsi qu'à leurs mécanismes d'action.

A. Acides gras : généralités

1. Structure et nomenclature

Les acides gras (AG) de formule (CH_3-$(CH_2)_n$-COOH) sont l'unité de base des lipides ; ils sont composés de deux parties :

- une partie hydrophobe représentée par une chaîne hydrocarbonée terminée par un groupe méthyle
- une partie hydrophile correspondant à un groupe acide carboxylique.

Il est possible d'établir une classification des acides gras basée sur :

- la longueur de la chaîne carbonée toujours constituée d'un nombre pair d'atomes de carbone (chez les eucaryotes) ; les acides gras sont dits à chaîne courte lorsque celle-ci

comporte de 4 à 8 atomes de carbone, à chaîne moyenne entre 10 et 14 atomes de carbone et enfin à chaîne longue pour 16 atomes de carbone et plus

- le nombre de doubles liaisons éthyléniques ou nombre d'insaturations dans la chaîne carbonée ; ce nombre varie de 0 à 6 et permet de distinguer (**Figure 19**) :

  - ✓ les acides gras saturés (AGS), c'est-à-dire sans double liaison carbone-carbone
  - ✓ les acides gras insaturés qui présentent une (acides gras mono-insaturés ou AGMI) ou plusieurs doubles liaisons (acides gras polyinsaturés ou AGPI)

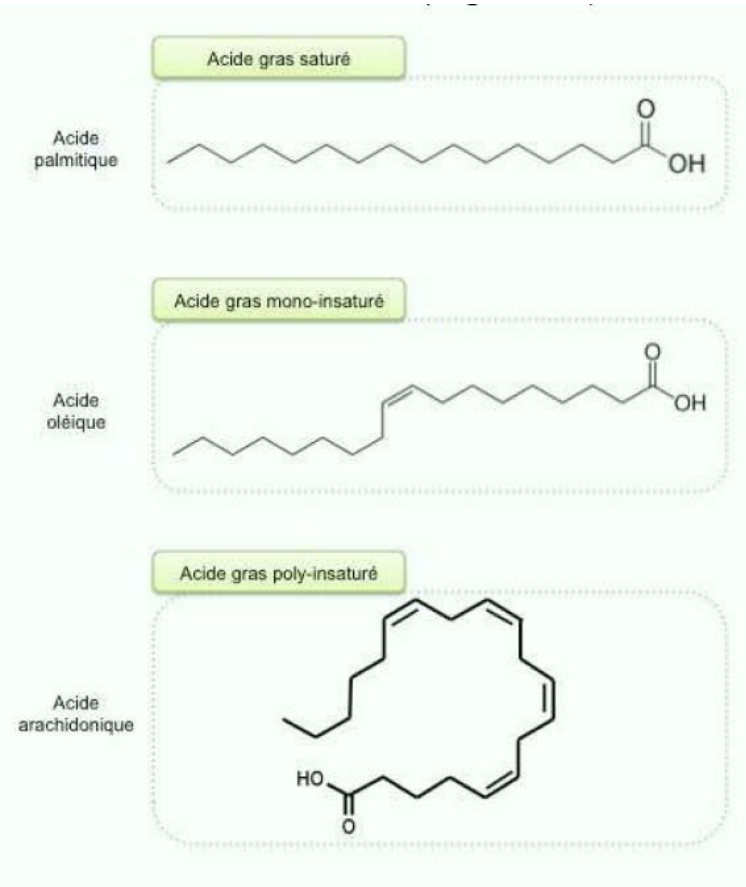


Figure 19 : Exemple d'acides gras saturé, mono-insaturé et polyinsaturé.

Les insaturations sont généralement distantes les unes des autres de 3 atomes de carbone et de configuration *cis*. Dans cette configuration *cis*, les deux chaînes hydrocarbonées, sont situées de part et d'autre de la double liaison, et se trouvent sur un même plan par rapport à la double liaison. Les configurations *trans* sont rarement trouvées à l'état naturel. Chez les ruminants, elles proviennent d'isomérisation d'acides gras polyinsaturés (AGPI) par les enzymes produites par des bactéries du rumen. Elles peuvent

également être produites lors de procédés industriels, notamment dans la fabrication de margarines (Steinhart *et al.*, 2003).

Il existe plusieurs nomenclatures pour désigner la position des doubles liaisons sur la chaîne carbonée, la plus utilisée par les biologistes étant celle qui désigne les acides gras en mentionnant successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturations et la position de la première double liaison, numérotée à partir de l'extrémité méthyle terminale (numérotation en n- ou ω-) (**Figure 20**).

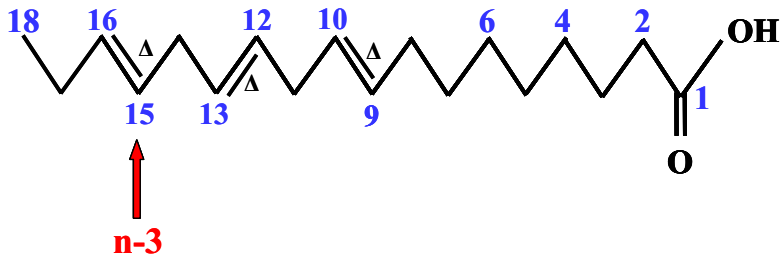


Figure 20 : Nomenclature des acides gras, exemple de l'acide α-linolénique. **La numérotation commence toujours à l'extrémité carboxyle (carbone 1) et se termine à l'extrémité méthyle (carbone n). On nomme toujours l'atome de carbone au numéro le plus faible impliqué dans la double liaison. Ici, les doubles liaisons se situent entre les atomes de carbone 9 et 10 ; 12 et 13 ; 15 et 16. Ainsi selon la nomenclature utilisée par les chimistes on nomme cet acide gras 18 :3 Δ9, 12, 15, le numéro après les deux points indiquant le nombre de doubles liaisons, le Δ représentant la double liaison, et le numéro qui le suit, sa position. Selon la nomenclature des biochimistes on le nomme 18 :3 n-3. La première double liaison se situe au niveau du 3ème atome de carbone avant le carbone n et les autres doubles liaisons sont situées tous les trois atomes de carbone.**

Ainsi on attribue un nom systématique à chaque acide gras. Cependant on peut leur attribuer aussi un nom commun en fonction des graisses dans lesquelles on les retrouve (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Nomenclature systématique et commune des principaux acides gras.

Nom systématique	Nom commun / (abréviation)	Formule simplifiée	
Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	16:0	AGS
Acide octadécanoïque	Acide stéarique	18:0	
Acide eicosanoïque	Acide arachidique	20:0	
Acide docosanoïque	Acide béhénique	22:0	
Acide tétracosanoïque	Acide lignocérique	24:0	
Acide 9-hexadécénoïque	Acide palmitoléique	16:1 n-7	AGMI
Acide 9-octadécénoïque	Acide oléique / (OA)	18:1 n-9	
Acide 11-eicosénoïque	Acide gadoléique	20:1 n-9	
Acide 13-docosénoïque	Acide érucique	22:1 n-9	
Acide 15-tétracosénoïque	Acide nervonique	24:1 n-9	
Acide 9,12-octadécadiénoïque	Acide linoléique / (LA)	18:2 n-6	AGPI n-6
Acide 6,9,12-octadécatriénoïque	Acide γ-linolénique / (GLA)	18:3 n-6	
Acide 8,11,14-eicosatriénoïque	Acide dihomo-γ-linolénique / (DGLA)	20:3 n-6	
Acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque	Acide arachidonique / (AA)	20:4 n-6	
Acide 7,10,13,16-docosatétraénoïque	Acide docosatétraénoïque	22:4 n-6	
Acide 4,7,10,13,16-docosapentaénoïque		22:5 n-6	
Acide 9,12,15-octadécatriénoïque	Acide α-linolénique / (ALA)	18:3 n-3	AGPI n-3
Acide 11,14,17-eicosatriénoïque		20:3 n-3	
Acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	Acide eicosapentaénoïque / (EPA)	20:5 n-3	
Acide 7,10,13,16,19-docosapentaénoïque	Acide docosapentaénoïque / (DPA)	22:5 n-3	
Acide 4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	Acide docosahexaénoïque / (DHA)	22:6 n-3	

2. Propriétés

Leur longue chaîne carbonée apporte aux acides gras un caractère hydrophobe. S'ils sont insolubles dans l'eau on peut en revanche les solubiliser dans les solvants organiques comme l'hexane, l'éther ou le chloroforme. Le point de fusion d'un acide gras diminue avec le nombre d'insaturations et augmente avec la longueur de la chaîne carbonée.

La présence de doubles liaisons qui sont les cibles privilégiées de réactions chimiques, comme la fixation d'hydrogène (hydrogénation naturelle ou industrielle), ou d'iode, confère aux acides gras une grande instabilité. L'oxydation enzymatique ou non des doubles liaisons, aboutissant à la production de peroxydes, est par exemple responsable du rancissement des graisses.

Les acides gras dans l'organisme sont présents en faible quantité sous forme libre, ils sont principalement retrouvés sous forme estérifiée avec le glycérol (triglycérides et phospholipides) ou avec le cholestérol, ou liés par une liaison amide à la dihydrosphingosine pour les sphingolipides. Ils proviennent soit de la synthèse *de novo* par l'organisme, soit des apports alimentaires (importance des AG essentiels que l'organisme ne peut synthétiser). Ils peuvent être stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides et ils constituent alors une réserve énergétique considérable. Les acides gras libres sont directement utilisables dans le métabolisme après activation en acyl-CoA.

Les lipides absorbés (principalement grâce à la formation de structures micellaires sous l'action des sels biliaires, et après hydrolyse par des lipases) ou synthétisés, doivent être véhiculés par le plasma entre les différents tissus et organes, pour leur utilisation et leur stockage. Etant insolubles dans l'eau, les lipides sont transportés sous forme de lipoprotéines (sauf pour les acides gras libres qui sont insérées dans les poches hydrophobes de l'albumine sérique). Les lipoprotéines sont constituées de l'association entre des lipides apolaires (triglycérides et esters de cholestérol), des lipides amphiphiles (phospholipides et cholestérol) et des protéines (apolipoprotéines ou apoprotéines). On identifie quatre grands groupes de lipoprotéines (**Figure 21**) :

- les chylomicrons produits par les entérocytes et qui permettent d'apporter les acides gras aux adipocytes pour la lipogenèse et aux tissus périphériques qui vont les utiliser, et qui sont dégradés au niveau du foie
- les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) qui transportent les triglycérides néo synthétisés et le cholestérol à partir du foie

- les lipoprotéines de basse densité (LDL) qui proviennent du métabolisme des VLDL et qui sont riches en cholestérol
- les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui interviennent dans l'élimination du cholestérol des tissus et dans le métabolisme des VLDL et des chylomicrons

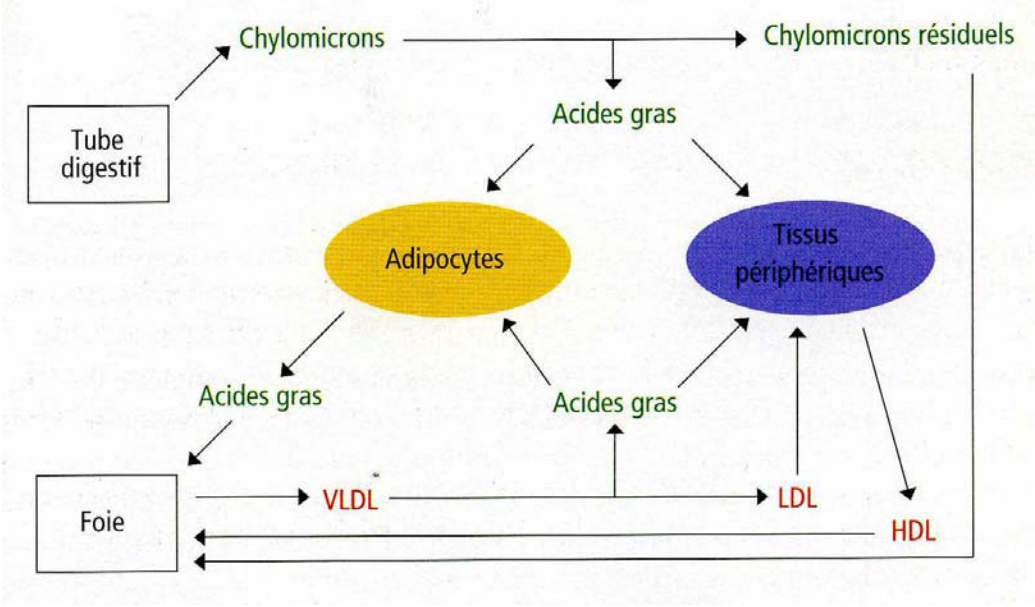


Figure 21 : Transport des lipides par les lipoprotéines (tiré de Médart, 2009).

Les sources alimentaires selon leur origine, animale ou végétale, apportent en proportion variable les différents groupes d'acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés. Les acides gras saturés sont surtout présents dans les aliments d'origine animale (lait, fromages, beurre, viandes, etc…), mais on en retrouve aussi dans certaines huiles végétales comme l'huile de palme et les graisses industrielles (margarines). Les acides gras mono-insaturés sont retrouvés dans les aliments d'origine animale (les produits laitiers, les viandes, les charcuteries, le saindoux, etc…) et végétale (huile d'olive, très riche en acide oléique, huiles de colza, noisette, arachide et tournesol). Les acides gras polyinsaturés, quant à eux, sont présents en quantité moindre dans notre alimentation par rapport aux deux autres groupes d'acides gras. Parmi eux on distingue les AGPI n-6 et les AGPI n-3. Les AGPI n-6 sont apportés par certaines viandes et charcuteries, par les œufs, le beurre, la graisse d'oie. Les huiles végétales comme les huiles de maïs, de tournesol, de colza, de noix, de soja, demeurent cependant les sources alimentaires les plus riches en AGPI n-6 et notamment en acide linoléique (18:2 n-6). Les AGPI n-3 sont ceux que l'on retrouve en moins grande quantité

dans notre alimentation. L'acide alpha-linolénique (18:3 n-3) est principalement retrouvé dans certains végétaux verts, dans les graines oléagineuses et les huiles végétales de colza, de noix, de soja, de lin et de germe de blé. Les AGPI n-3 à plus longue chaîne, dont les représentants majoritaires sont l'acide eicosapentaènoïque ou EPA (20:5 n-3) et l'acide docosahexaènoïque ou DHA (22:6 n-3), sont principalement retrouvés dans les poissons gras marins comme le saumon, la sardine et le hareng. Ils proviennent de l'élongation et de la désaturation du 18:3 n-3, dont la conversion en EPA est possible (mais limitée) chez l'humain, tandis que la conversion en DHA est faible.

La **figure 22** offre un aperçu de la biosynthèse des différents acides gras à chaîne longue, à partir des AG endogènes ou des AG essentiels d'origine alimentaire.

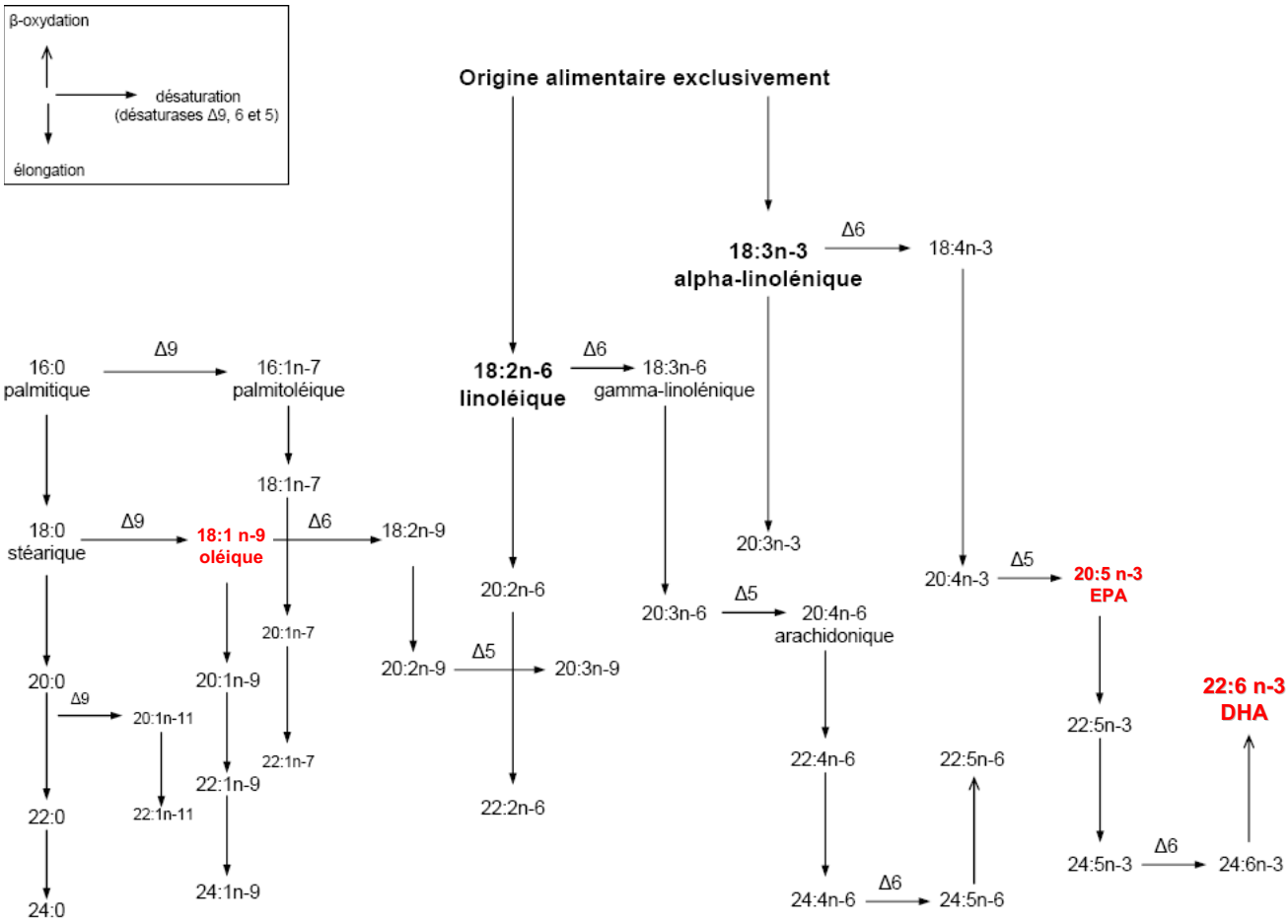


Figure 22 : Biosynthèse des acides gras chez les mammifères

L'acide linoléique (18:2 n-6 ou LA) et l'acide α-linolénique (18:3 n-3 ou ALA) sont des acides gras essentiels, apportés uniquement par l'alimentation. La biosynthèse des autres acides gras est sous le contrôle d'enzymes (désaturases) qui ajoutent des doubles liaisons entre les atomes de carbone 9 et 10 pour la Δ-9 désaturase, 6 et 7 pour la Δ-6 désaturase et 5 et 6 pour la Δ-5 désaturase. Les réactions d'élongation permettent d'allonger la chaîne carbonée de deux atomes de carbone. La β-oxydation a l'effet inverse. L'existence d'une Δ-4 désaturase permettant de passer du 22 :5 n-3 au 22 :6 n-3 n'a jamais été démontrée chez les mammifères, mais a été mise en évidence dans une algue marine (Meyer *et al.*, 2003).

Dans l'organisme, les acides gras sont stockés majoritairement dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides, où ils représentent une réserve importante d'énergie. Cependant, les acides gras sont aussi présents dans tous les tissus, où ils jouent un rôle structurel en tant que composant des membranes biologiques (sous forme de phospholipides, glycolipides) et fonctionnel, en tant que précurseurs des prostaglandines et modulateurs de l'expression des gènes. On sait que la composition des lipides membranaires n'est pas génétiquement déterminée, mais qu'elle dépend des acides gras disponibles pour les tissus périphériques. Le type d'acides gras disponibles est influencé par les apports alimentaires. On comprend alors aisément que les différents acides gras apportés par l'alimentation puissent intervenir dans la modulation de mécanismes cellulaires fondamentaux et jouer ainsi un rôle important dans la survenue et l'évolution de certaines pathologies comme le cancer.

B. AGPI n-3 et cancer du sein

1. Données épidémiologiques et données expérimentales chez l'animal

Les premières données ayant permis de relier acides gras alimentaires et cancer du sein viennent des études écologiques qui ont mis en évidence l'existence d'une corrélation positive entre la quantité d'acides gras consommés et le taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein (Armstrong and Doll, 1975; Rose, 1986). Les données, pour la plupart, suggèrent toutefois que l'association entre les acides gras alimentaires et le cancer du sein dépendrait plus du type d'acide gras, et en particulier des acides gras insaturés, que de la quantité d'acides gras consommée (Greenwald, 1999; Rose and Connolly, 1999). Des études épidémiologiques ont ainsi été menées sur la relation entre les apports alimentaires en AGMI ou en AGPI totaux et le risque du cancer du sein. Souvent les résultats de ces études étaient assez discordants (Boyd *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1996; Smith-Warner *et al.*, 2001), et il a alors été proposé de bien distinguer les différentes familles d'acides gras au sein des AGPI totaux. Ainsi, certaines études ont analysé le rapport des AGPI n-6/n-3 sur le risque de cancer du sein (Bagga *et al.*, 2002; Goodstine *et al.*, 2003; Simonsen *et al.*, 1998). Ces études ont montré que ces deux familles d'AGPI pouvaient influencer de façon opposée le risque de cancer du sein ainsi que son évolution. En 1973, une étude montrait que le risque de développer un cancer du sein était plus élevé chez les femmes des pays industrialisés, exception faite pour les Japonaises (Buell,

1973). Ces observations ont été attribuées à des habitudes alimentaires différentes et notamment à la grande consommation de poissons gras marins dans la population japonaise (Wynder *et al.*, 1986). D'autres études épidémiologiques descriptives ont également montré qu'une consommation élevée en poissons riche en AGPI n-3 était corrélée avec une faible incidence du cancer du sein (Caygill *et al.*, 1996; Hursting *et al.*, 1990; Kaizer *et al.*, 1989; Sasaki *et al.*, 1993). L'étude de l'évolution des habitudes alimentaires des femmes japonaises au cours de ces dernières décennies a par ailleurs permis de mettre en évidence qu'une diminution de la consommation en poisson au profit d'une augmentation de la consommation d'huiles végétales riches en AGPI n-6 s'accompagnait d'une augmentation de l'incidence du cancer du sein (Lands *et al.*, 1990). Toutefois, l'ensemble des études épidémiologiques qui ont été menées pour déterminer s'il existait une relation entre la consommation en AGPI n-3 et le risque de développer un cancer du sein apportent des résultats plutôt controversés et très dépendants du type d'étude (cohorte ou cas-témoins) et de la méthodologie employée (questionnaires alimentaires ou biomarqueurs). Ainsi les études basées sur un questionnaire alimentaire ne montrent pas de relation entre les AGPI n-3 et le risque de cancer du sein. En revanche, parmi les études qui utilisent des biomarqueurs, plusieurs montrent une relation inverse entre le taux de DHA et le risque de cancer du sein (Maillard *et al.*, 2002; Pala *et al.*, 2001; Simonsen *et al.*, 1998). La plupart des résultats apportés par les expérimentations animales montrent quant à eux que les deux grandes familles d'AGPI n-3 et n-6 présentent des effets opposés sur la cancérogenèse mammaire, avec un effet promoteur pour les AGPI n-6 et un effet inhibiteur pour les AGPI n-3, même si certaines études remettent en cause ces effets (Fay and Freedman, 1997). Il semblerait alors que ce soit notamment le rapport n-3/n-6 (idéal quand proche de 1:4) ainsi que le statut oxydant des régimes qui puissent influencer la tumorigenèse mammaire (Cognault *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 1993; Gonzalez *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 1998).

De ce fait, étant donné les résultats contradictoires de certaines études épidémiologiques et de certaines expérimentations animales qui ne considèrent chaque famille d'AGPI que de manière individuelle, une approche plus générale, qui prend en compte les interactions entre les différents acides gras (saturés, mono ou polyinsaturés), a par la suite été proposée (Bougnoux *et al.*, 2006). Ce type d'analyse a montré qu'un taux d'acides gras monoinsaturés associé à un faible rapport AGPI n-6/n-3 diminuait le risque de cancer du sein. Ainsi le risque de cancer du sein ne devrait pas être associé à une unique famille d'acides gras, mais plutôt à un profile lipidique particulier, le lipidome (Bougnoux *et al.*, 2008).

2. Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire

Il est important de pouvoir asseoir scientifiquement le concept selon lequel l'alimentation jouerait un rôle dans la diminution du risque pathologique, ainsi que dans certains cas de traitement. Ceci nécessite d'améliorer les connaissances des processus moléculaires impliqués dans l'oncogenèse et de l'action des acides gras sur ces mécanismes.

La transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale s'accompagne de propriétés nouvelles pour la cellule, telles qu'une prolifération incontrôlée associée à une diminution de l'apoptose, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une capacité à susciter l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif. Des études *in vitro* réalisées sur des lignées cellulaires de cancer du sein montrent que les AGPI n-3 peuvent jouer sur ces différentes propriétés. De nombreuses expériences montrent tout d'abord un effet cytotoxique ou anti-prolifératif de certains AGPI sur les cellules tumorales et pas d'effet sur les cellules normales (Diggle, 2002). L'effet inhibiteur des AGPI n-3 semble être corrélé au nombre d'insaturations de la chaîne hydrocarbonée. Plusieurs études ont observé une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires plus marquée lors d'un traitement par le DHA, que par l'EPA ou l'ALA (Begin and Ells, 1987; Grammatikos *et al.*, 1994; Rose and Connolly, 1990; Thoennes *et al.*, 2000). L'effet inhibiteur de ces AGPI n-3 varie également selon le type de lignées cellulaires utilisées (Chajes *et al.*, 1995). Plusieurs mécanismes d'action ont alors été proposés.

Begin et collaborateurs favorisent l'hypothèse de la lipoperoxydation et corrèlent l'inhibition de prolifération par l'EPA et le DHA à leur capacité à générer des radicaux libres superoxydes et à stimuler la production des produits secondaires de la peroxydation lipidique (hydroperoxydes). De plus, l'utilisation de la vitamine E réduit à la fois la mort cellulaire et les produits de la lipoperoxydation des cellules tumorales supplémentées en AGPI n-3 (Begin, 1990). En augmentant la production des ROS (espèces réactives de l'oxygène) et de produits de la lipoperoxydation, les AGPI n-3 modifient également le métabolisme de la membrane mitochondriale provoquant une libération de cytochrome C et l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses mammaires traitées (Colquhoun and Schumacher, 2001; Schley *et al.*, 2005). Rose et collaborateurs ont montré que l'effet inhibiteur des AGPI n-3 pouvait être dû à une inhibition de la synthèse des eicosanoïdes issus de l'acide arachidonique (AA) (Rose and Connolly, 1990). En effet, en s'incorporant dans les phospholipides membranaires au détriment de l'AA, l'EPA supprime ainsi la synthèse de prostaglandines de l'AA connues pour stimuler la prolifération cellulaire. Les AGPI n-3 pourraient également inhiber les PPAR

puisque une diminution de l'activité transcriptionnelle des PPARγ, corrélée à une inhibition de la prolifération, a été mise en évidence dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 traitée à l'ALA, l'EPA ou au DHA (Thoennes *et al.*, 2000). Les AGPI n-3 peuvent en effet agir comme ligands des PPAR qui atténuent la transcription de gènes dépendants de NF-kappaB. Ainsi la production du facteur pro-angiogénique VEGF, dépendante de PGE2, tout comme les niveaux d'expression des gènes anti-apoptotiques bcl-2 et bcl-X(L), peuvent être diminués (Wendel and Heller, 2009). En termes de cibles moléculaires, il a également été montré au laboratoire que la diminution de prolifération des cellules MDA-MB-231 par le DHA et l'EPA semble passer par le ralentissement du cycle cellulaire par une inhibition du complexe actif cdk1-cycline B1, nécessaire au passage de la phase G2 à la mitose (Barascu *et al.*, 2006). D'autres cibles comme les PKC pourraient être affectées par l'incorporation d'AGPI n-3 dans les membranes (Welsch, 1987). Il a ainsi été montré qu'un traitement par l'EPA et le DHA diminue fortement l'isoforme α de la PKC dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Moore *et al.*, 2001) et que l'utilisation d'ARN interférant avec la PKCα provoque une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses mammaires (Yuen *et al.*, 1999). En 2006, Judé et collaborateurs ont proposé plusieurs cibles et mécanismes d'action pouvant être affectés par les AGPI n-3 et impliqués dans des pathologies comme le cancer et les maladies cardiovasculaires (Jude *et al.*, 2006) (**Figure 23**). On y retrouve bien sûr les PKC, proposées comme marqueurs dans le cancer du sein depuis longtemps déjà (Mackay and Twelves, 2003), et dont les isoformes principalement impliquées sont la PKCα et la PKCδ, respectivement dans la prolifération (Lahn *et al.*, 2004) et les métastases (Debies and Welch, 2001). Ces isoformes peuvent alors être régulées différemment en fonction des acides gras qui composent le DAG, et notamment les AGPI n-3. L'homéostasie calcique, impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses, pourrait également être modulée par les AGPI n-3. En effet, il a été montré que l'EPA pouvait conduire à la déplétion des stocks du RE tout en inhibant leur remplissage *via* l'influx capacitif calcique, dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, (Palakurthi *et al.*, 2000). Cette inhibition peut être annulée par l'ajout de vitamine E, ce qui souligne le rôle important de la lipoperoxydation dans les effets des AGPI n-3. Les AGPI n-3 pourraient également réguler l'expression et l'activité de certaines MMP (Suzuki *et al.*, 1997). Ainsi Harris et collaborateurs ont trouvé une diminution d'activité des MMP 2 et 9 dans différents tissus de rats nourris avec un régime enrichi en DHA (Harris *et al.*, 2001). Cet effet pourrait entre autres s'expliquer par le fait que les AGPI n-3 entrent en compétition avec l'acide arachidonique pour être incorporés dans les phospholipides membranaires. Cela pourrait alors avoir une conséquence sur la production de prostaglandines

PGE2 et affecter l'activité des MMP. Enfin, les jonctions communicantes gap (jcg) et les canaux ioniques sont également proposés comme cibles potentielles. En effet il est connu que les cellules cancéreuses possèdent un nombre réduit de jcg, comportant en général des anomalies (Yamasaki *et al.*, 1995). Jiang et collaborateurs ont montré que l'acide gamma linolénique (18:3 n-6) pouvait réduire l'adhésion cellules tumorales-endothélium, en partie en augmentant les jcg de l'endothélium (Jiang *et al.*, 1997). Toutefois, la modulation des jcg par les AGPI n-3 dans le cancer du sein n'a pas encore était explorée. En ce qui concerne les effets des AGPI n-3 sur les canaux ioniques, ils peuvent être directs ou indirects (intervention de seconds messagers régulateurs des canaux). Nous allons aborder ce sujet par la suite (Gillet *et al.*, 2010).

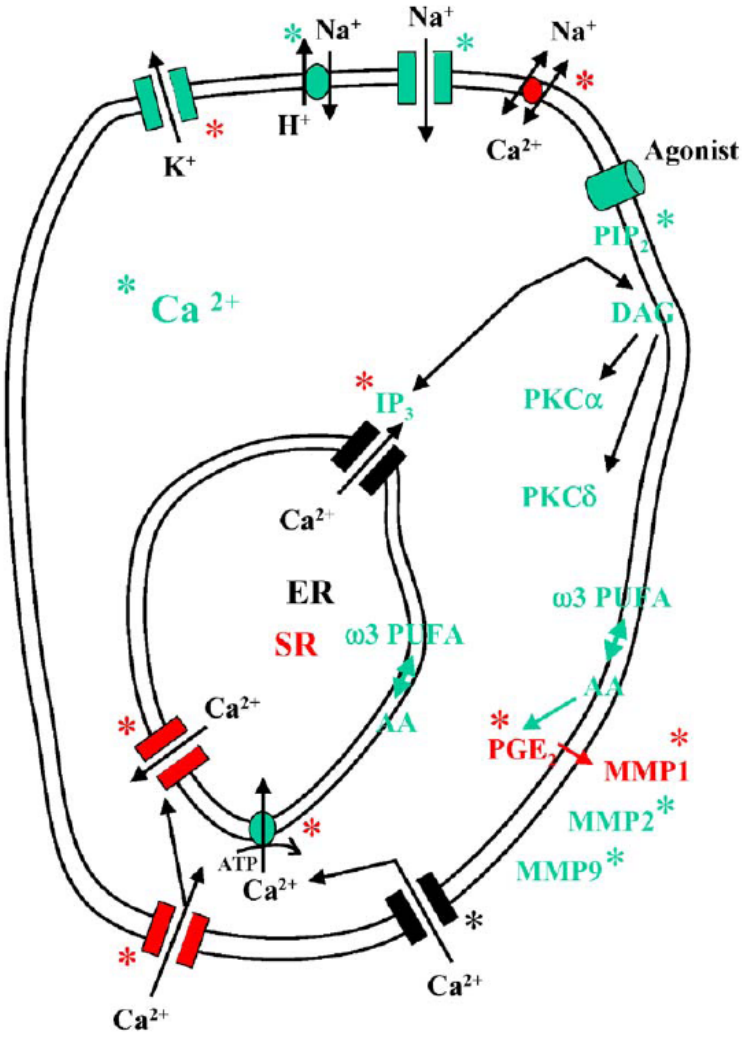


Figure 23 : Schéma récapitulatif des différents mécanismes pouvant être affectés par les AGPI n-3 (tiré de Jude *et al.*, 2006). **Les astérisques indiquent les cibles des AGPI n-3, en fonction des couleurs : les composants spécifiques des cellules cardiaques sont en rouge, ceux des cellules cancéreuses en noir, et ceux qui sont communs aux deux sont en vert.**

3. Acides gras, microdomaines membranaires et canaux ioniques

Les lipides membranaires peuvent être organisés sous forme de phases différentes au sein de la membrane plasmique : la phase gel, la phase liquide ordonnée et la phase fluide désordonnée. Les microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides et connus sous le nom de "lipid rafts" (radeaux lipidiques) sont constitués de lipides sous forme de phase liquide ordonnée. Ils sont caractérisés comme étant les domaines non solubilisés par les détergents non-ioniques tels que le triton X-100 et sont présents dans les fractions légères obtenues après ultracentrifugation sur gradient de saccharose (Brown, 2006). De nombreuses protéines sont associées aux radeaux lipidiques, comme les GPI-AP (glycosylphosphatidylinositol anchored proteins) qui sont attachées au feuillet externe de la membrane grâce au glycosylphosphatidylinositol, les tyrosine kinases Src qui sont ancrées au feuillet interne de la membrane grâce à leurs modifications lipidiques (palmitoylations et myristoylations), les protéines liant le cholestérol comme les cavéolines, les protéines G hétéromériques et les annexines se liant aux phospholipides. Ces microdomaines sont dits « dynamiques » car les protéines et les lipides peuvent en quelque sorte y circuler. Des ensembles de protéines de signalisation ainsi que d'autres protéines peuvent y être séquestrés et ils pourraient alors servir de plateforme pour l'exécution de différentes fonctions (trafic membranaire, signalisation, polarisation cellulaire, etc…) (**Figure 24**). Le cytosquelette associé à la membrane joue également un rôle dans l'organisation de la structure de ces domaines (Parton and Richards, 2003; Rajendran and Simons, 2005).

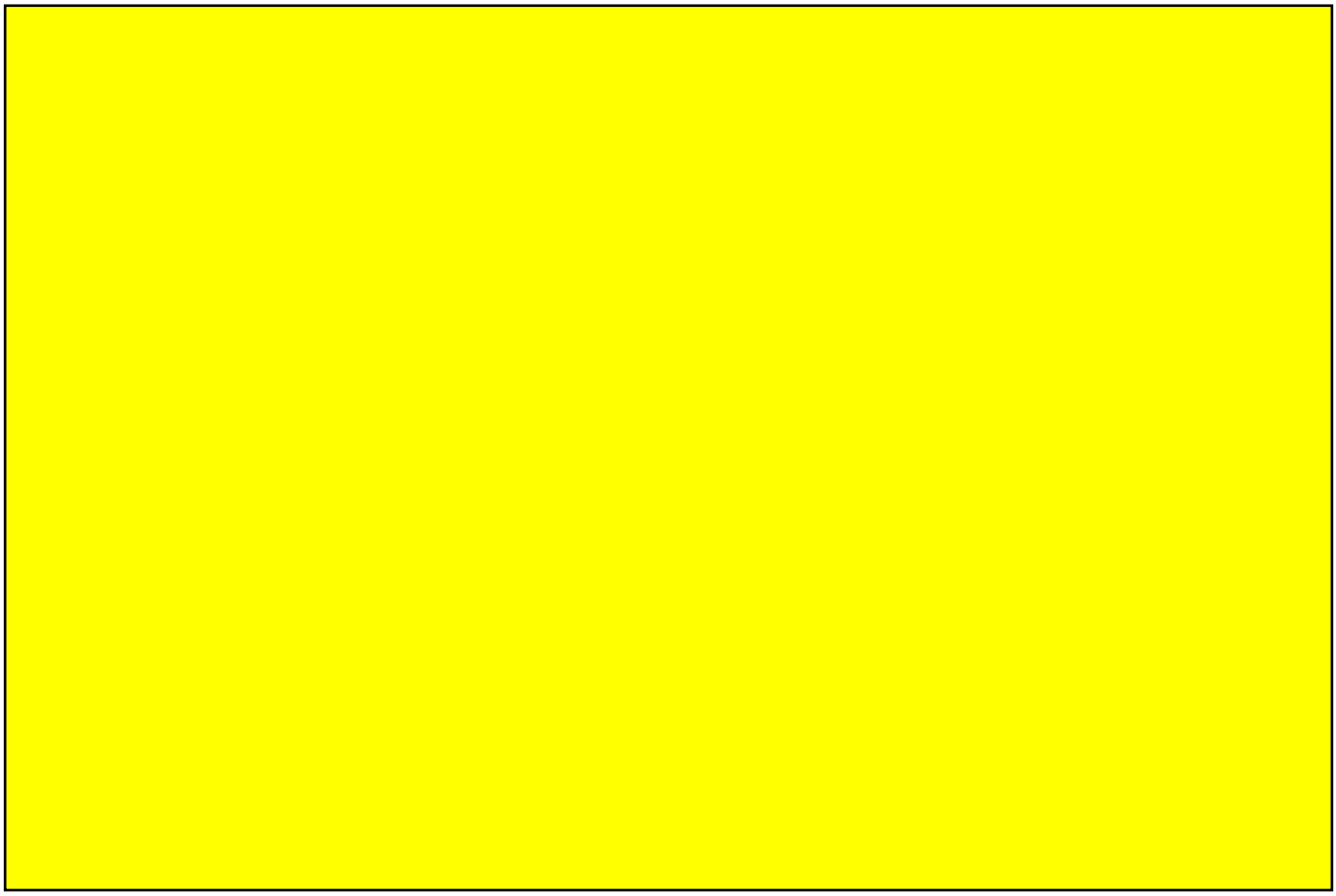


Figure 24 : Représentation schématique des radeaux lipidiques ("lipid rafts") dans la membrane plasmique (tiré de Maguy *et al.*, 2006). **Les radeaux lipidiques flottent dans la membrane, constituant des plateformes de signalisation distinctes, dépendantes des sous-types de radeaux. Certains ont une structure invaginée, ce sont les cavéoles. Ici sont représentés les complexes de régulation des canaux ioniques dans les cardiomyocytes.**

Il a été décrit que l'incorporation d'AGPI n-3 au sein de la membrane plasmique pouvait modifier la structure, et de ce fait la fluidité, des microdomaines membranaires que sont les radeaux lipidiques, et en particulier les cavéoles, un sous-type de radeaux qui sont des invaginations de membrane plasmique (60-80 nm de diamètre) riches en cavéoline, une protéine de 20-25 kD qui se lie au cholestérol (Schmitz and Grandl, 2008; Stillwell *et al.*, 2005). Ces microdomaines jouent un rôle important dans la compartimentation, la modulation et l'intégration des voies de signalisations cellulaires, et peuvent ainsi être impliqués dans certaines pathologies humaines. L'apport alimentaire d'AGPI n-3 peut en ce sens avoir un effet bénéfique sur des pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les désordres inflammatoires, les maladies auto-immunes, le diabète, l'obésité et le cancer (Ma *et al.*, 2004). En effet, l'incorporation des AGPI n-3 dans les microdomaines membranaires peut altérer leur composition lipidique et affecter la structure de la membrane en excluant le cholestérol, pour donner une "phase désordonnée", plus fluide. Ce changement de caractéristiques biophysiques

de la membrane cellulaire peut conduire à une modification de la fonction des protéines qui y résident et engendrer une modification des réponses cellulaires (**Figure 25**). Ainsi, à titre d'exemple, l'effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 peut être dû à l'inhibition de l'activation des lymphocytes T suite au déplacement des protéines de signalisation acylées se trouvant dans les radeaux lipidiques (Li *et al.*, 2006). Giorgione et collaborateurs ont montré par ailleurs qu'une légère modification de la composition lipidique des microdomaines membranaires pouvait moduler l'action de la PKC (Giorgione *et al.*, 1998). Dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, l'apport d'AGPI n-3 entraîne des modifications importantes des lipides membranaires qui conduisent à une diminution de la quantité de récepteurs à l'EGF localisés dans les radeaux lipidiques et à une augmentation de la quantité totale de récepteurs à l'EGF phosphorylés qui sont impliqués dan l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Schley *et al.*, 2007).

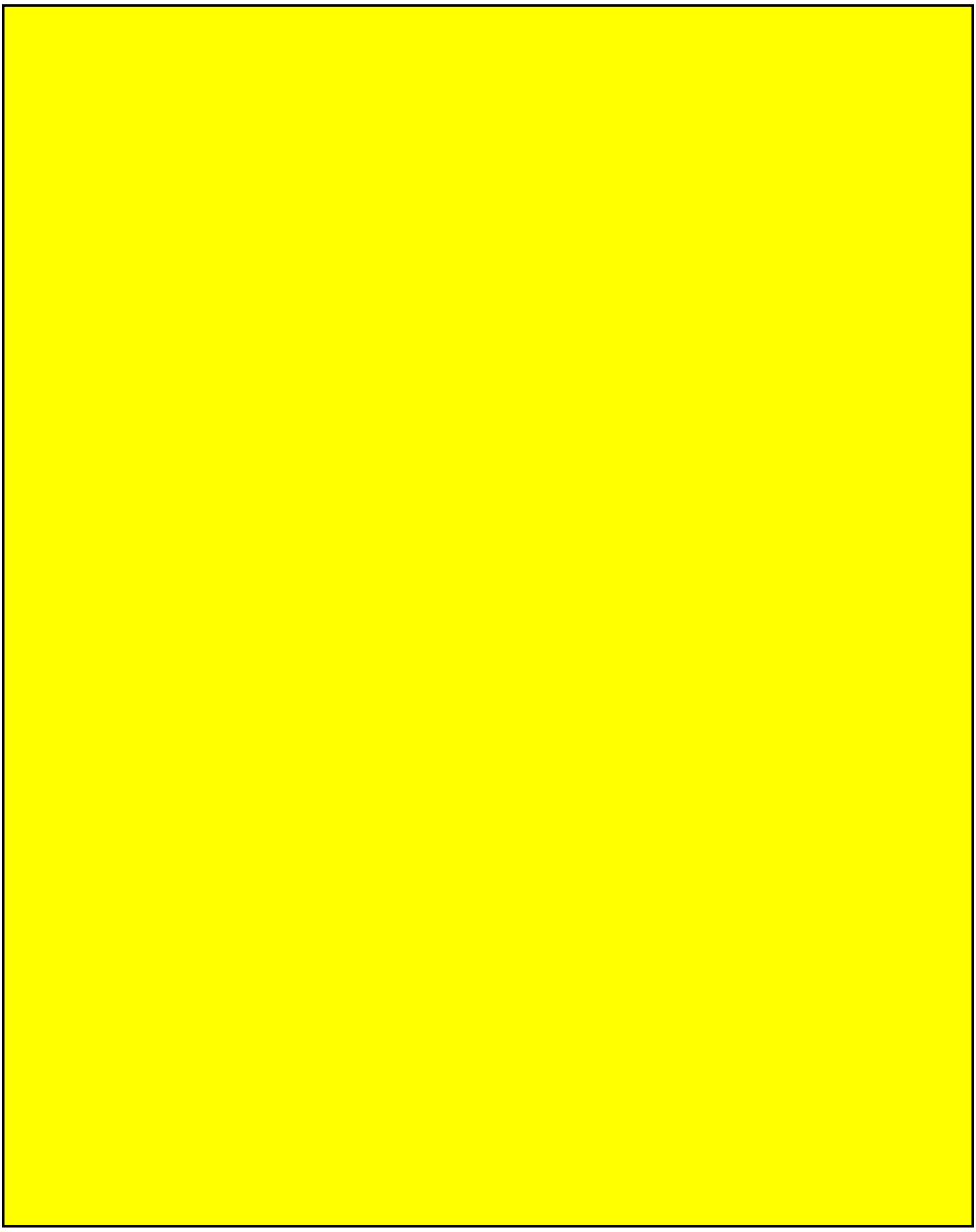


Figure 25 : Incorporation des AGPI n-3 dans les microdomaines membranaires (tiré de Ma *et al.*, 2004). **L'EPA et le DHA s'incorporent dans les phospholipides membranaires ; la présence d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne très flexibles n'est pas compatible avec les propriétés de la phase ordonnée des radeaux lipidiques et des cavéoles. La localisation des protéines spécifiques aux microdomaines peut être perturbée, conduisant alors à une modulation des évènements de signalisation cellulaire en aval.**

Différents canaux ioniques sont également retrouvés dans les radeaux lipidiques et les cavéoles (Balijepalli and Kamp, 2008; Maguy *et al.*, 2006). Cette localisation préférentielle permet la régulation des canaux cardiaques ou vasculaires potassiques ($K_V1.4$, $K_V1.5$, $K_V2.1$, K_V4, $K_V7.1$, Kir2, Kir3, K_{ATP}), calciques ($Ca_V1.2$), sodiques ($Na_V1.5$), ainsi que des canaux HCN4 et de l'échangeur Na^+/Ca^{2+}. La plupart du temps, l'importance de cette localisation a été démontrée par l'utilisation de la méthyl-β-cyclodextrine qui permet de dépléter les membranes en cholestérol. Il a de plus été montré que d'une part, les canaux ioniques dans le cœur pouvaient d'une part interagir directement avec la cavéoline (Cav-3), et que d'autre part la colocalisation des récepteurs β_2-adrénergiques (β2-AR) dans ces microdomaines témoignait de l'importance de la concentration des voies de signalisation de type β2-AR/adénylate cyclase/PKA à ce niveau. Ainsi, l'environnement lipidique des microdomaines membranaires peut réguler directement les propriétés des canaux ioniques, comme cela a été montré pour le cholestérol et le $K_V1.5$ (Abi-Char *et al.*, 2007), mais également pour les phosphoinositides et le Kir6.2 (Haider *et al.*, 2007). Il peut être responsable par ailleurs de régulations indirectes, par la modulation de voies de signalisation qui régulent spécifiquement les canaux ioniques d'une manière très localisée, comme c'est le cas pour le PIP_2, présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique et que l'on retrouve dans les cavéoles, et qui est le précurseur d'importants seconds messagers que sont l'IP3 et le DAG. Nous allons revenir dans la partie suivante sur la régulation des canaux Na_V par les AGPI. D'autres canaux, comme les ENaC (Epithelial Sodium Channel), sont retrouvés dans les radeaux lipidiques et peuvent être modulés par les AGPI n-3. L'équipe de Sarah Sariban-Sohraby a montré en effet dans des cellules de rein d'amphibien (lignée cellulaire A6) que les canaux sodiques épithéliaux étaient distribués de manière hétérogène dans la membrane apicale des cellules et que les canaux actifs se localisaient au niveau des microdomaines membranaires (Shlyonsky *et al.*, 2003). Par ailleurs l'EPA est capable d'augmenter la perméabilité au sodium de la membrane apicale, ce phénomène étant dépendant de la compartimentation de la PKA dans les microdomaines et de sa liaison à une AKAP qui ancre la PKA à la membrane (Mies *et al.*, 2007). Récemment, il a été montré que l'échangeur Na^+/H^+ (NHE-1), qui joue un rôle essentiel dans la régulation du pH dans la plupart des tissus, est retrouvé dans les microdomaines membranaires riches en cholestérol et en cavéoline, lorsqu'il est surexprimé dans des fibroblastes, et que la déplétion de la membrane en cholestérol modifie sa distribution et entraîne une activation de l'échange Na^+/H^+ (Tekpli *et al.*, 2008). Dans les cellules cancéreuses mammaires, son inhibition par un analogue d'alkyl-lysophospholipide entraîne une inhibition de la prolifération (Besson *et al.*, 1996). Il est également connu pour être régulé par les AGPI n-3 (Goel *et al.*, 2002).

C. Effets des AGPI n-3 dans le cancer et les maladies cardiovasculaires : implication des canaux sodiques voltage-dépendants

Les AGPI n-3 peuvent moduler des protéines membranaires comme les canaux ioniques, de manière directe ou indirecte. Nous nous sommes attachés à décrire leurs effets sur le $Na_V1.5$ retrouvé dans les cellules cardiaques et les cellules cancéreuses mammaires, dans une mini-revue à paraître dans le journal *Biochimie* (**Gillet et al., 2010**).

Deuxième partie

Matériel et méthodes

I. Etude des lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses

A. Culture cellulaire

1. Cellules utilisées

Les lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC®). Nous nous sommes intéressés principalement à une lignée cellulaire, MDA-MB-231 (réf. ATCC HTB-26™), établie à partir d'un épanchement pleural d'adénocarcinome mammaire humain (Cailleau *et al.*, 1974). Cette lignée présente des caractéristiques biologiques particulières : p53 mutée, absence de récepteurs aux œstrogènes,… et elle exprime des canaux sodiques voltage-dépendants fonctionnels. La lignée MDA-MB-468 (HTB-132™) provenant également de cellules récupérées d'effusion pleurale (Cailleau *et al.*, 1978) a été utilisée. En revanche cette lignée n'exprime pas le Na_V. Ces lignées possèdent des récepteurs membranaires et cytoplasmiques différents mais sont toutes les deux capables de proliférer, migrer et envahir les tissus (Zhang *et al.*, 1991).

2. Conditions de culture, solutions et supports utilisés en culture cellulaire

a) Conditions de culture

Les lignées de cellules cancéreuses sont très sensibles à leurs conditions de culture. Il est donc nécessaire de contrôler rigoureusement ces conditions qui sont importantes pour la prolifération cellulaire d'une part, et pour les risques de contamination bactérienne ou fongique d'autre part. Pour minimiser ces risques de contaminations, la culture cellulaire est réalisée dans une salle de culture équipée d'un sas avec surpression. Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions de stérilité, sous des hottes à flux laminaire, et le matériel utilisé est acheté stérile ou préalablement stérilisé par autoclavage.

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de différentes tailles et dont le fond est traité de façon à ce que les cellules puissent adhérer. Les bonnes conditions de prolifération cellulaire nécessitent de placer les cellules dans un incubateur où la température (37°C), la teneur en CO_2 (5%) et l'humidité (atmosphère saturée en H_2O) sont contrôlées.

L'intérêt majeur des lignées cellulaires est de pouvoir disposer à tout moment d'un bon modèle d'étude pour l'identification de mécanismes cellulaires. En effet, l'entretien de ces lignées est relativement facile et la densité cellulaire est également facile à contrôler. Cependant, l'observation *in vitro* d'un mécanisme n'est pas obligatoirement le reflet de ce qui se passe *in vivo*. En effet dans une tumeur, une population cellulaire complètement hétérogène est en étroite relation avec le stroma et le système sanguin environnant, contrairement aux modèles cellulaires utilisés en culture qui présentent une population de clones relativement homogènes et sans interaction avec le stroma tumoral. De plus, les conditions de cultures *in vitro* sont différentes des conditions *in vivo*. Ainsi les milieux de culture sont certainement beaucoup plus riches en nutriments par rapport à ce que peut recevoir une cellule au sein d'une tumeur. De même, le taux d'oxygène apporté et dissous dans le milieu est certainement beaucoup plus élevé qu'au sein de la tumeur, qui se trouve dans des conditions d'hypoxie. Il est également important de souligner que dans nos conditions de culture, les cellules prolifèrent dans des systèmes à deux dimensions contrairement à ce que l'on observe *in vivo* lors de la croissance tumorale. En ce qui concerne l'interaction avec le stroma et la prolifération dans un système en trois dimensions, l'utilisation de matrice comme le Matrigel™ nous permet de nous rapprocher de ces conditions.

b) Milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté de sérum de veau fœtal

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture de type Eagle, modifié par Dulbecco (DMEM, Cambrex, USA) et contenant toutes les espèces ioniques nécessaires, tous les acides aminés indispensables de la série L, de nombreuses vitamines, 4,5 g/L de D-Glucose, 584 mg/L de L-glutamine et 3,7 g/L de $NaHCO_3$. Ce milieu est supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal (SVF) qui apporte, entre autres, les facteurs de croissance et cytokines nécessaires à la prolifération des cellules. Le pH est contrôlé par le tampon bicarbonate ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + CO_3^-$, principal tampon du sang), qui nécessite un maintien du taux de CO_2 de l'atmosphère de culture à 5%. Du rouge de phénol est présent dans le milieu DMEM et sert

d'indicateur de pH, il est rouge à pH physiologique (pH 7,4) et devient jaune lors d'une acidose prononcée ou rose violacé lors d'une alcalose. L'osmolarité du DMEM est comprise entre 271 et 287 mOsm/kg.

c) D-PBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

Le milieu D-PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Cambrex, USA) est une solution saline qui permet de laver les cellules de leur milieu de culture et de faciliter le détachement des cellules (**Tableau 5**). Le pH de cette solution est compris entre 7,2 et 7,6 et son osmolarité entre 257 et 302 mOsm/kg.

Tableau 5 : Composition du D-PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}

Sels inorganiques	Composition en g/L
KCl	0,2
KH_2PO_4	0,2
NaCl	8
$NaHPO_4 + 7\ H_2O$	2,16

d) Trypsine-EDTA

Cette solution de Trypsine-EDTA 1:250 (Cambrex, USA) permet de mettre en suspension les cellules adhérentes, par protéolyse des protéines d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire (**Tableau 6**). Elle ne contient ni calcium, ni magnésium et présente un chélateur calcique : l'EDTA.

Tableau 6 : Composition de la solution de Trypsine – EDTA

Composés	Composition en g/L
Glucose	1
KCl	0,4
NaCl	8
$NaHCO_3$	0,58
Rouge de Phénol	2
Trypsine (origine animale)	0,5
EDTA (versene)	0,2

e) Supports utilisés en culture cellulaire

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de culture de 25, 75 ou 175 cm^3 stériles, dont la surface, en polystyrène, est traitée physiquement pour permettre l'adhésion cellulaire. Ces flacons possèdent un bouchon avec un filtre poreux qui permet de conserver le milieu de culture stérile tout en assurant les échanges gazeux.

Certaines expériences nécessitent l'utilisation d'une matrice extracellulaire sur le support de culture. Dans ce cas il est possible de recouvrir la surface par du Matrigel™ (BD Biosciences, France), initialement récupéré dans des cas de tumeurs murines de type Engelbreth-Holm-Swarm, qui sont des tumeurs très riches en protéines de la matrice extracellulaire. Le Matrigel™ est une membrane basale solubilisée qui polymérise à température ambiante de façon à produire une matrice biologiquement active. Il s'agit par conséquent d'un milieu mimant la matrice extracellulaire d'un épithélium. Ses composants majoritaires sont la laminine (56%), le collagène IV (31%), des protéoglycanes et de l'entactine (8%). En plus de ces composants, le Matrigel™ complet (réf BD356234) contient de nombreux facteurs de croissance.

Pour réaliser une fine matrice extracellulaire sur le fond des boîtes de culture, le Matrigel™ doit être décongelé quelques heures auparavant à +4°C et laissé dans la glace. De même, tout le matériel de culture (pipettes et boîtes) doit avoir été au préalable conservé au froid. On place alors ≈ 1 mL de solution de Matrigel™ dans le flacon de culture de façon à bien le répartir et à former une couche homogène. Le surplus est récupéré et peut être utilisé pour d'autres boîtes ou recongelé. Le flacon de culture est ensuite placé à l'incubateur à 37°C pendant une demi-heure à une heure avant l'ensemencement, afin de former une fine couche. On peut aussi réaliser une matrice tridimensionnelle en déposant de plus grands volumes et en ensemençant les cellules avant que le Matrigel™ ne soit complètement polymérisé.

Pour les études électrophysiologiques, il est nécessaire d'avoir des cellules bien isolées et accessibles à la pipette de patch. C'est pourquoi les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre (Corning Incorporated, USA), à une faible densité de 15 000 à 20 000 cellules/mL dans un volume de 2 mL. Dans le cas de l'utilisation d'une sonde fluorescente pour mesurer le pH cellulaire, les artéfacts dus à l'auto-fluorescence du plastique doivent être évités. Pour cela les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Petri à fond de verre (WillCo-Dishes® Glass Bottom dish GWSt-3522, WillCo Wells BV, The Netherlands).

f) Agents pharmacologiques

La tétrodotoxine (Tetrodotoxin – citrate free, réf L85 03, Latoxan, France) a été utilisée à une concentration finale de 30 µM pour bloquer la totalité du courant sodique des cellules MDA-MB-231. La solution mère (3 mM) est obtenue en solubilisant la TTX en poudre dans de l'acide acétique dilué au 1/1000. Cette toxine est extraite à partir d'organes du poisson globe (Fugu). La vératridine (réf 676950, Calbiochem®, Merk, Germany) qui permet d'augmenter le courant sodique persistant, a été utilisée à 10 µM ou à 50 µM. Cette molécule est dissoute dans l'éthanol pour réaliser la solution mère.

g) Acides gras

Les acides gras mono-insaturés (18:1n-9, acide oléique ou OA) et poly-insaturés de la famille n-3 (22:6n-3, acide docosahexaènoïque ou DHA) sont utilisés sous forme d'esters méthyliques (Sigma-Aldrich, France). Les ampoules d'acides gras doivent être conservées à -20°C jusqu'à leur échantillonnage en tubes en verre ambré et fermés sous azote. L'ampoule

d’acide gras est mise quelques minutes à température ambiante puis centrifugée pendant 1 minute à 700 x g. L’acide gras est transféré dans un tube en verre préalablement rincé au méthanol puis à l’hexane. Pour évaporer la totalité du solvant (éthanol), le tube est placé dans une centrifugeuse reliée à une pompe à vide. La masse d’acide gras récoltée est déterminée par la pesée du tube. Pour obtenir une solution stock à 150 mM, le volume d’éthanol à ajouter est calculé en tenant compte de la masse molaire et de la densité de l’ester méthylique d’acide gras. La solution d’acide gras est ensuite distribuée dans des tubes de verre ambré de 1,5 mL. Afin de protéger l’acide gras des dégradations causées par l’oxygène, après évaporation de l’éthanol, les tubes d’acide gras sont fermés sous atmosphère d'azote et peuvent être conservés plusieurs mois à -20°C. Pour vérifier la bonne concentration de l’échantillonnage, trois échantillons, pris respectivement au début, au milieu et en fin de distribution sont repris dans 1 mL d’hexane contenant une quantité connue de l’ester méthylique du 19:0, utilisé comme standard interne. Ces trois échantillons sont analysés en chromatographie en phase gazeuse. Ainsi grâce à la surface du pic du standard interne, correspondant à une masse connue, nous pouvons déterminer précisément la quantité d’acides gras contenus dans chaque échantillon et par conséquent déterminer le volume d’éthanol à ajouter pour retrouver la concentration finale de 150 mM. Les solutions stocks d’acides gras (150 mM dans l'éthanol à 99%), préparées une à une en fonction des besoins, sont conservées à -20°C.

Les dilutions à partir de la solution mère sont réalisées dans du DMEM 5% SVF. Un volume d'éthanol équivalent est utilisé pour les conditions témoins. Par expérience, les cellules ne sont pas mises en présence de l'acide gras au moment de leur ensemencement. En effet nous avons remarqué que le fait d'ensemencer les cellules avec du DHA pouvait les empêcher d'adhérer au support de culture, et de ce fait conduire à leur mort. Ainsi, avant de traiter les cellules avec les acides gras nous attendons qu'elles aient toutes adhéré. La plupart du temps le traitement est réalisé le lendemain de l'ensemencement et les milieux sont changés tous les 2 jours afin de maintenir la quantité d'acides gras disponibles pour les cellules.

3. Protocoles utilisés en culture cellulaire

a) Entretien et trypsination

Afin de standardiser les expériences dépendantes de la culture cellulaire, il est important de contrôler le taux de confluence des cellules en culture utilisées pour chaque expérience. Ceci implique l’utilisation d’un ou plusieurs flacons dits "d’entretien" où les cellules sont

trypsinées chaque semaine le même jour et réensemmencées à la même densité. On peut ainsi utiliser directement les cellules du flacon d'entretien pour une expérience ou repréparer des flacons de culture pour une expérience ultérieure. Dans ce cas il est alors possible de standardiser la confluence des cellules ainsi que le temps de prolifération des cellules préalable à chaque nouvelle expérimentation.

La trypsination, qui consiste à dissocier les cellules les unes des autres et à les décoller de leur support de culture, à l'aide d'une enzyme, la trypsine, est une opération classique de culture cellulaire mais qui n'en reste pas moins une étape très importante. La solution de trypsine contient aussi de l'EDTA, un chélateur des ions divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}, qui va permettre ainsi de limiter les interactions dépendantes de ces ions. La trypsine, qui est une protéase douce, va permettre, par son activité de digestion protéolytique, de rompre les adhérences cellule-cellule et cellule-support/matrice. L'activité enzymatique de la trypsine est inhibée par le SVF, ainsi, avant chaque trypsination il est nécessaire d'effectuer deux rinçages avec du D-PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} après avoir retiré le milieu de culture du flacon. Un volume de solution de trypsine-EDTA permettant de recouvrir tout le tapis cellulaire est alors versé dans le flacon de culture. Le temps d'attente ainsi que la température pour que toutes les cellules soient bien dissociées et décollées du flacon sont légèrement variables en fonction du type cellulaire. Dans le cas de la lignée MDA-MB-231, cinq minutes à température ambiante suffisent. Les cellules sont alors reprises dans une solution de culture normale contenant du SVF. Il faut cependant attendre que toutes les cellules soient bien décollées pour ne pas risquer de sélectionner, au fur et à mesure des passages, les clones qui adhèrent le moins à leur matrice et qui pourraient représenter une sous-population de cellules ayant des propriétés invasives différentes. A l'inverse, un temps d'attente trop long entraîne une lyse cellulaire (visualisé par la libération de longs filaments d'ADN nucléaire dans le milieu).

D'une manière générale, dans les conditions d'entretien, les cellules sont trypsinées et transférées dans une nouvelle boîte de culture lorsqu'elles arrivent à environ 90% de confluence. Au cours de cette étape, communément appelée "passage", toutes les cellules ne sont pas réensemencées et il existe un risque de sélection de population. Il existe de plus le risque que les cellules dérivent et s'éloignent du phénotype décrit originellement, au fur et à mesure des cycles de trypsination/réensemencement. C'est pourquoi il est très important de bien contrôler le nombre de passages et de veiller à ne travailler qu'avec des cellules à faible numéro de passage.

b) Cryogénisation et décryogénisation des cellules en culture

Afin de conserver les lignées cellulaires, nous les stockons sous forme cryogénisées.

Pour la cryogénisation, les cellules sont trypsinées puis récupérées dans du milieu de culture normal et comptées. On effectue ensuite une centrifugation (5 min à 700 x g) pour éliminer le surnageant et le remplacer par le milieu de cryopréservation (10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO), 30% de SVF et 60% de milieu de culture normal). Les suspensions cellulaires sont alors aliquotées de façon à avoir 1 à 1,5.10^6 cellules par cryotube. On congèle alors de façon lente (d'abord au congélateur -80°C puis dans l'azote liquide à -196°C) pour éviter la formation de cristaux.

Pour décryogéniser les cellules, il faut que l'opération soit conduite le plus rapidement possible. L'ampoule à décongeler est transférée rapidement de l'azote liquide au bain-marie chauffé à 37°C. Une fois décongelée, la suspension cellulaire est immédiatement transférée dans un flacon contenant du milieu de culture normal, préalablement placé à l'incubateur, afin d'équilibrer le pH et la température. Le milieu de culture doit être remplacé dès le lendemain pour éliminer toute trace du milieu de cryopréservation, et en particulier le DMSO.

c) Comptage des cellules

Les différents protocoles de culture cellulaire nécessitent la plupart du temps de connaître le nombre de cellules dans les suspensions utilisées. Il existe différentes façons de réaliser la numération cellulaire, par exemple directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (cellule de numération ou hématimètre), ou par compteur automatique de cellules. Au laboratoire nous utilisons deux types d'hématimètres qui diffèrent par leur quadrillage : la cellule de Malassez (1 rectangle = 0,01 mm^3, 1 bande = 0,1 mm^3, la cellule = 1 mm^3) et la cellule de Thoma (1 rectangle = 0,004 mm^3, la cellule = 0,1 mm^3).

B. Evaluation de la prolifération cellulaire : test MTT

1. Principe

La prolifération cellulaire a été étudiée par une technique colorimétrique d'évaluation de la viabilité cellulaire : la technique de réduction des sels de tétrazolium ou test MTT. C'est une méthode simple et relativement précise lorsque les conditions d'ensemencement et de

traitement sont standardisées. Cette technique quantitative permet d'évaluer les effets de traitements externes sur la croissance cellulaire.

Le test MTT (Mosmann, 1983) est basé sur la transformation de sels de tétrazolium de couleur jaune (3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphénylTétrazolium bromide ou MTT) en cristaux violet de formazan par la succinate déshydrogénase majoritairement mitochondriale, uniquement active dans les cellules vivantes. Les cristaux insolubles dans des solvants aqueux sont solubilisés dans du DMSO avant de réaliser une lecture par un spectrophotomètre. L'intensité de la réaction colorée mesurée à 570 nm ou densité optique est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Nous avons préféré cette technique à celle de coloration par le bleu trypan qui permet d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique et par conséquent de déterminer la proportion de cellules vivantes et de cellules mortes, mais qui est peu sensible et non adaptée au comptage de cellules à grande échelle.

2. Méthode

Les cellules sont ensemencées à J0 dans une plaque 24 puits (l'expérience se fait aussi parfois dans des plaques 6 puits) à raison de 40000 cellules par puits dans 600 µL de milieu de culture, en présence ou non de la substance d'intérêt. Les cellules sont alors laissées en présence de la drogue pendant une période allant de 24 h à 5 jours. A la fin des différentes périodes d'incubation, le milieu est aspiré et remplacé par 400 µL d'une solution de MTT à une concentration de 0,5 mg/mL dans du milieu de culture. Les plaques sont alors replacées à 37°C pour une durée d'incubation variant suivant la lignée cellulaire testée : 60 min pour les MDA-MB-231, 30 min pour les MDA-MB-468.

La période d'incubation terminée, le surnageant est aspiré et les cristaux de formazan solubilisés avec 400 µL de DMSO à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation douce pendant 10 min. On transfère alors 200 µL de chaque puits dans une plaque 96 puits permettant de mesurer l'absorbance à 570 nm au spectrophotomètre. L'absorbance est comparée à celle du DMSO seul.

C. Evaluation de la migration et de l'invasion in vitro

Il est possible d'évaluer l'aptitude des cellules cancéreuses à dégrader leur environnement, puis à migrer, dans le but de rejoindre la circulation générale et former des métastases dans différents sites pour lesquels elles présentent une affinité particulière. Afin de déterminer, *in vitro,* et de quantifier les différents phénomènes qui interviennent dans ces étapes précoces du processus métastatique, nous avons défini deux paramètres. La migration, qui désigne globalement l'aptitude des cellules à bouger sur une matrice, et qui pourrait s'apparenter au mouvement amiboïde. L'invasion, qui représente l'aptitude des cellules cancéreuses à dégrader leur matrice extracellulaire puis à migrer. Une des particularités des cellules cancéreuses, dans la migration, est leur plasticité. En effet, elles peuvent s'adapter à leur nouvel environnement ou à une nouvelle contrainte, en modifiant le type de migration utilisée. La perte d'interactions cellule-cellule tend vers un type mésenchymateux, tandis que la perte d'intégrines ou de protéases amène une migration de type amiboïde. Afin de déterminer et quantifier *in vitro* la capacité de migration des différentes lignées cancéreuses sous l'influence ou non de différentes molécules (toxines, acides gras, etc…), nous avons utilisé la technique des inserts placés dans des plaques 24 puits.

C'est une technique simple et rapide qui s'applique aux cellules adhérentes.
Elle permet, dans un cas, de mesurer le passage vertical de cellules à travers un filtre de polyéthylène-téréphtalate (aux pores de 8 µm de diamètre), ce que nous définissons par le terme de "migration" (Inserts: BD 353097, BD Biosciences, France). Dans l'autre cas, elle permet de mesurer le passage de cellules à travers ce même filtre, cette fois-ci recouvert d'un film de Matrigel™ (Inserts BD 354480, BD Biosciences, France). Nous avons alors défini le terme d'"invasion cellulaire" *in vitro* pour désigner l'activité de dégradation du Matrigel™ précédant la migration à travers le filtre. Dans les deux cas, nous mesurons le nombre de cellules ayant migré à travers le filtre seul, ou à travers le filtre recouvert de Matrigel™, et qui adhèrent à la face inférieure de l'insert.

Les tests sont réalisés en présence ou non de la substance à tester, sur la durée de l'expérience (en général 24 h). Les inserts sont placés dans les puits d'une plaque 24 puits, délimitant ainsi deux compartiments séparés dans un cas par le filtre et dans l'autre par ce même type de filtre recouvert de Matrigel™. Le compartiment supérieur est rempli par 200 µL de la suspension cellulaire (à une densité de 2.10^5 ou 3.10^5 cellules/mL) réalisée dans le milieu de culture habituel des cellules (milieu de type DMEM + 5% de SVF). Le compartiment inférieur est, quant à lui, rempli de 800 µL du même milieu de culture mais

contenant 10% de SVF, de façon à réaliser un gradient chimio-attractant d'hormones et facteurs de croissance (**Figure 27**). Il existe alors un tropisme entraînant un déplacement des cellules du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur. Il est important de noter que pour tous les types cellulaires étudiés, la taille des pores (8 µm de diamètre) est bien inférieure à celle des cellules et que le passage au travers du filtre nécessite une déformation active des cellules. La migration des cellules ne peut donc en aucun cas s'expliquer par le seul effet de la gravité. Après 24 heures de migration / invasion dans l'incubateur, les inserts sont récupérés, lavés de leur milieu de culture dans du PBS et les cellules sont fixées au méthanol puis colorées à l'hématoxyline. Les cellules de la face supérieure de l'insert sont enlevées à l'aide d'un coton-tige et uniquement les cellules ayant traversé le filtre sont comptées (**Figure 26**). Le comptage s'effectue au microscope inversé à un grossissement x 200 (objectif x 20 et oculaire x 10). Pour les tests de migration, le choix des champs de comptage est relativement subjectif : nous avons choisi de compter cinq champs en fonction de leur représentativité de la répartition totale des cellules sur l'insert. Les moyennes sont faites par insert et par jour, et relativisées par rapport au témoin adéquat. Dans le cas des tests d'invasion, le nombre de cellules retrouvées sur la face inférieure de l'insert après 24h est beaucoup moins important que pour un test de migration, aussi nous avons décidé de compter tout l'insert, ce qui est beaucoup plus précis et moins soumis à des artéfacts de choix. Enfin, il est aussi très important de bien contrôler le temps de migration/invasion réellement effectué, dans le cas contraire, les résultats peuvent être faussés. Si le temps d'invasion est allongé, nous risquons de minimiser l'effet d'une substance inhibitrice : les premières cellules digérant le Matrigel™ avant de passer à travers le filtre puis des cellules suivantes passant uniquement par migration à travers les brèches déjà créées.

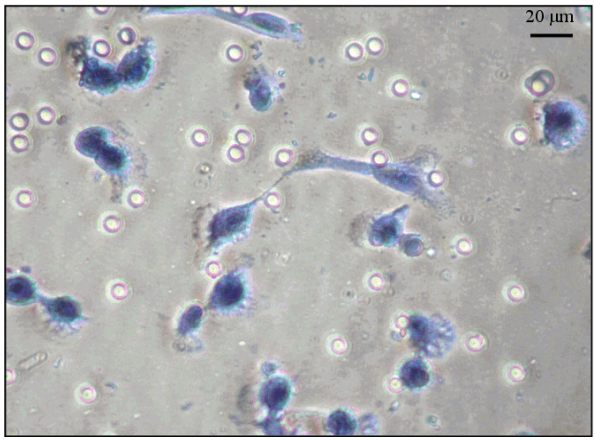


Figure 26 : Cellules MDA-MB-231 colorées à l'hématoxyline sur la face inférieure d'un insert de migration. **Les cercles blancs sont les pores de 8 µm de diamètre par lesquels les cellules doivent passer pour changer de compartiment.**

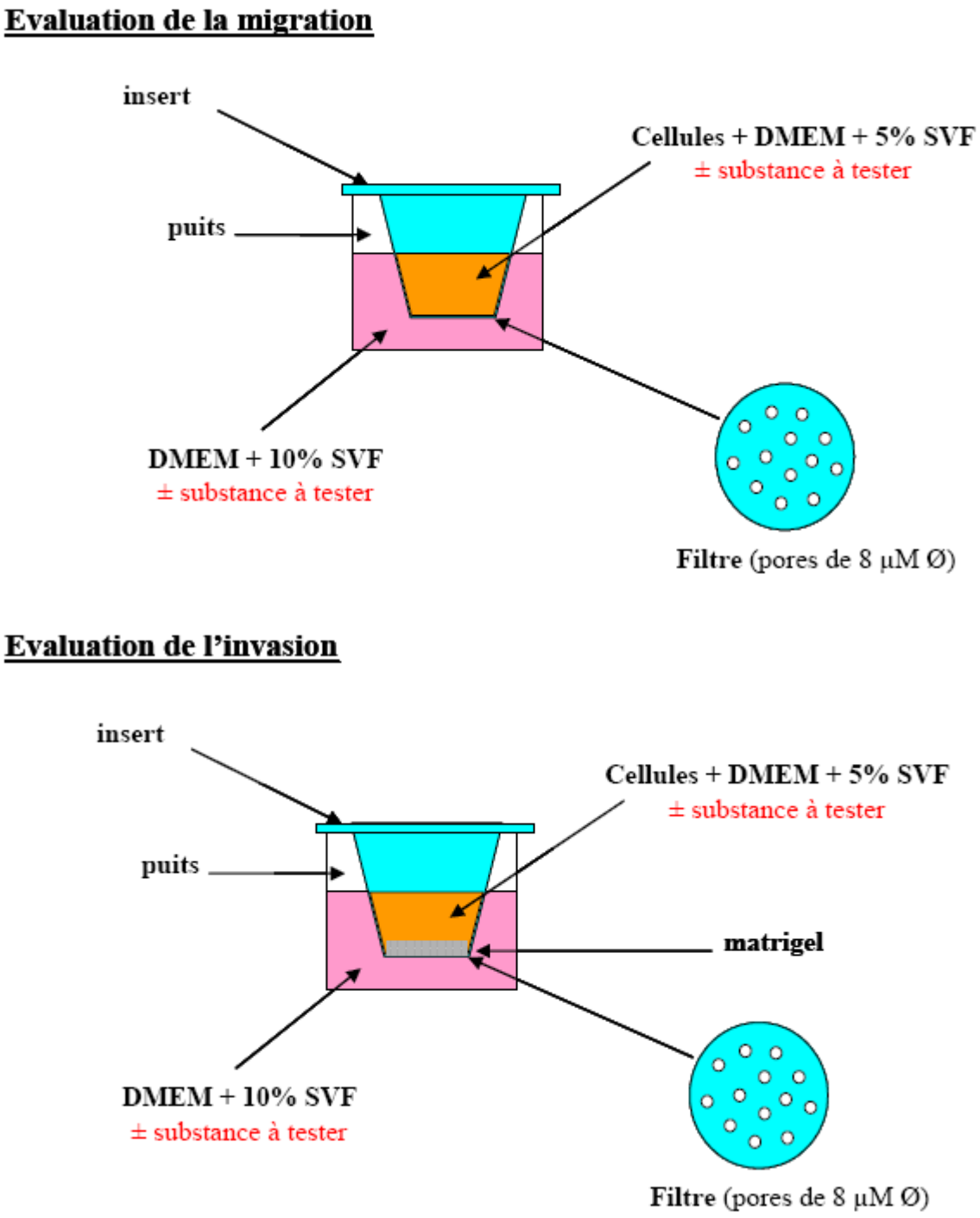


Figure 27 : Représentation schématique des tests de migration et d'invasion *in vitro*.

II. Enregistrements des courants ioniques : la technique de patch clamp

La technique du patch clamp est une méthode électrophysiologique permettant l'enregistrement de courants macro- ou microscopiques au travers de la membrane plasmique d'une cellule, lors de l'application d'un potentiel imposé. Elle a été mise au point par les chercheurs allemands Neher et Sackmann qui ont été les premiers a montré en 1976, qu'il était possible d'observer directement le courant induit par l'ouverture de canaux ioniques, ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1991 (Neher and Sakmann, 1976). Le principe de cette technique consiste à isoler électriquement un fragment de membrane plasmique (patch) d'une cellule par contact étroit et très résistant (seal) entre la cellule et une pipette de verre (dont le diamètre à l'extrémité est proche de 1 µm) à la surface de la membrane cellulaire. Cette méthode permet d'obtenir une résistance de l'ordre du gigaOhm (GΩ), c'est ce que l'on appelle le gigaseal. La force d'interaction entre l'extrémité de l'électrode de verre et la membrane cellulaire est tellement importante qu'aucune fuite n'est possible : ce gigaseal est mécaniquement stable. Cette première étape permet d'ores et déjà d'enregistrer les courants microscopiques dus à l'activité des canaux ioniques présents dans le morceau de membrane placé sous la pipette. Il s'agit alors de la première configuration possible de la technique du patch clamp : la configuration "cell-attached" (pipette attachée à la cellule).

A. Les différentes configurations du patch clamp

Hamill et collaborateurs ont initialement décrit quatre configurations (**Figure 28**) de la technique du patch clamp en 1981 (Hamill *et al.*, 1981). En plus de la configuration "cell-attached", on retrouve deux configurations particulières appelées patch excisé, "inside-out" et "outside-out", et la configuration "whole-cell" (cellule entière).

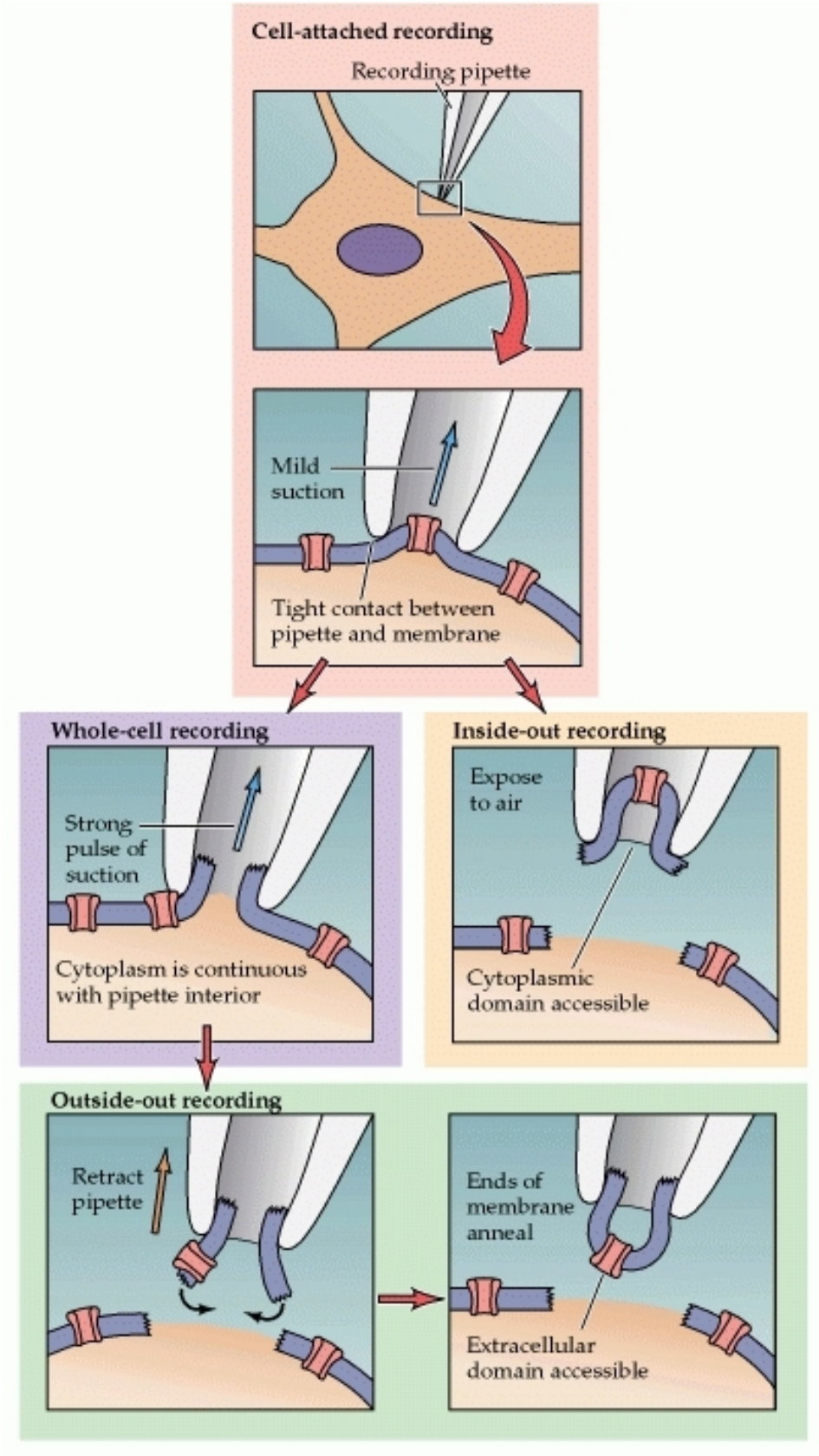


Figure 28 : Les différentes configurations du patch clamp (tiré de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A228&rendertype=box&id=A229).

A partir de la configuration "cell-attached", en créant une dépression plus importante dans la microélectrode de verre on va provoquer la rupture du morceau de membrane localisé sous la pipette tout en conservant une bonne qualité de scellement et obtenir la configuration "whole-cell" (également appelée "ruptured patch" ou patch rompu). On a ainsi accès au milieu intracellulaire via le milieu intra-pipette. Cette configuration, qui a été utilisée pour l'ensemble de nos études, permet l'enregistrement de courants globaux générés sur l'ensemble de la membrane cellulaire (**Figure 29**). En effet, la rupture de la membrane dans la pointe de la pipette crée une voie physique de passage entre la pointe de la pipette et l'intérieur de la cellule, par laquelle les ions et les molécules biologiques diffusent en fonction de leur gradient de concentration. Cette voie, plus ou moins obstruée par les débris de la membrane, est caractérisée sur le plan électrique par la valeur de sa résistance, ou résistance d'accès (Ra). D'après la loi d'Ohm (U= RxI ou I=U/R), plus cette résistance est basse, plus le courant enregistré pour un potentiel donné sera important. Cette configuration permet donc de contrôler le milieu intracellulaire mais présente un inconvénient : l'échange par diffusion entre la solution de la pipette et le milieu intracellulaire peut conduire à une altération de certaines voies de signalisation et à la perte d'éléments régulateurs des canaux. Afin de limiter la dialyse des composants intracellulaires il est possible d'utiliser la configuration patch perforé (Horn and Marty, 1988). Pour cela, au lieu de rompre le morceau de membrane sous la pipette, on ajoute un ionophore comme l'amphotéricine B qui va former des pores aspécifiques dans la membrane qui assurent un accès électrique à l'intérieur de la cellule (Rae *et al.*, 1991). Les pores formés sont alors perméables aux ions monovalents tels que le K^+, le Na^+, le Cs^+, le NH_4^+ et le Cl^-, mais ne permettent pas le passage de cations ou d'anions de valence supérieure, ni de celui des petites molécules, ce qui préserve une partie des voies de régulation intracellulaire.

A partir de la configuration cellule entière, une brusque traction permet d'exciser la portion de membrane attenante à la pipette. La face cytosolique de la membrane se retrouve alors en contact avec le milieu extracellulaire, c'est la configuration "inside-out". Elle est surtout utilisée pour l'étude de la régulation des canaux unitaires par des seconds messagers, des protéines kinases ou des protéines G purifiées et qui peuvent être introduits dans le bain. La configuration "outside-out" elle, est obtenue à partir de la configuration patch rompu par retrait de la pipette de patch. La membrane, dans ce cas, va se refermer sur elle-même, et et la face externe se retrouve à l'extérieur, directement en contact avec la solution extracellulaire, et le morceau de membrane obtenu peut contenir le canal ionique d'intérêt.

Pour toutes ces configurations l'enregistrement des courants ioniques se fait en mode "voltage clamp" ou voltage imposé, mais il est aussi possible de mesurer le potentiel de membrane des cellules : on parle alors de "current clamp" ou courant imposé.

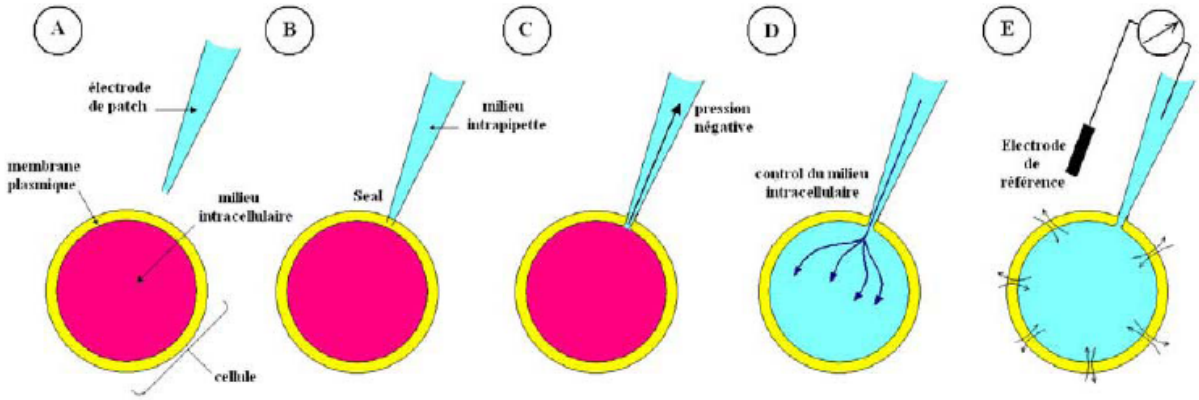


Figure 29 : Technique de patch clamp en configuration whole cell. **La technique consiste à appliquer une micro-électrode en verre (A), contre la membrane cellulaire et à créer un scellement hermétique : le « seal » (B). Cette micro-électrode contient un liquide conducteur mimant le milieu intracellulaire, dans lequel plonge un filament d'argent chloruré (AgCl). Suite à une dépression appliquée dans la pipette, la membrane va se rompre sous la pointe de la pipette sans altérer le seal (C). Le milieu contenu dans la pipette va diluer l'intérieur de la cellule (D) et l'électrode d'AgCl située dans la pipette va pouvoir enregistrer l'activité globale de tous les échanges ioniques de la cellule (E). Dans cette situation, il est donc possible de mesurer les courants ou le potentiel de membrane de la cellule.**

B. Dispositif expérimental

L'installation de patch clamp repose sur une table anti-vibrante (Ealing, USA) et l'isolation électrique est assurée par une cage de Faraday, reliée à la terre (**Figure 30**).

La boîte de Petri, contenant les cellules est placée sur une plaque de plexiglas installée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon® Eclipse® TE 2000, Japan). La pipette de patch est approchée de la cellule choisie grâce à l'utilisation d'un micromanipulateur piézoélectrique (MP-225, Sutter Instrument®, USA). Un micromanipulateur hydraulique (MMN-1, Narishige, Japon) assure l'approche de la tête de perfusion au dessus de la cellule. Ce système est relié à six capillaires connectés à 6 réservoirs permettant la perfusion de différentes solutions expérimentales.

La pipette de patch permet à la fois d'imposer le potentiel et de détecter les courants ioniques, c'est l'électrode de mesure. C'est elle qui assure la conversion du courant électrique d'origine

ionique en un courant purement électrique. Les pipettes sont réalisées à l'aide d'une étireuse verticale (PP-830, Narishige, Japon), à partir d'un capillaire de verre à hématocrite, un verre dit « mou », dont la structure lui confère une température de fusion relativement faible et un étirage aisé permettant d'obtenir facilement la forme voulue. Ce type de pipette présente l'avantage d'obtenir un scellement à la membrane très rapide et de très bonne qualité. Cependant, sa capacité électrique est très élevée, ce qui peut altérer l'enregistrement de certains signaux. La résistance des pipettes utilisées est généralement comprise entre 3 et 5 MΩ.

La pipette de patch est remplie de milieu intrapipette et installée sur le portoir de la tête de l'amplificateur. Un fil d'argent chloruré baigne dans le milieu intrapipette (MIP) et assure la connexion électrique au système d'amplification et d'enregistrement. Les mouvements ioniques générés par l'activité des canaux ioniques de la cellule sont alors transmis dans la pipette par le biais de la solution saline et conduits dans le fil d'argent par une réaction d'oxydoréduction du type :

$$Cl^- + Ag \rightleftharpoons AgCl + e^-$$

L'électrode de référence est une pastille d'argent chloruré (Ag / AgCl). Elle est plongée dans le milieu extracellulaire de façon à fermer le circuit électrique.

Ces deux électrodes sont connectées à l'amplificateur de patch clamp (Axopatch 200-B, Axon Instruments, USA) qui assure la conversion courant-tension : il amplifie le courant mesuré après l'avoir converti en tension. L'amplificateur est lui-même relié à une interface qui assure la conversion analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA), qui transmet le signal converti à un micro-ordinateur.

Les courants sont filtrés par un filtre Bessel 4 pôles à une fréquence de 2 kHz et sont échantillonnés à une fréquence de 10 à 50 kHz, suivant les protocoles utilisés.

Les expériences sont réalisées à température ambiante.

L'imposition du voltage ainsi que la visualisation et l'enregistrement des courants sont assistés par ordinateur et pilotés par le logiciel pClamp 8 (Axon Instruments, USA). Ce logiciel comporte deux modules : Clampex qui permet la stimulation et l'acquisition, et Clampfit qui permet l'analyse des données acquises. Les graphiques et courbes sont réalisés grâce au logiciel graphique Origin Pro 7 (Microcal Software, USA).

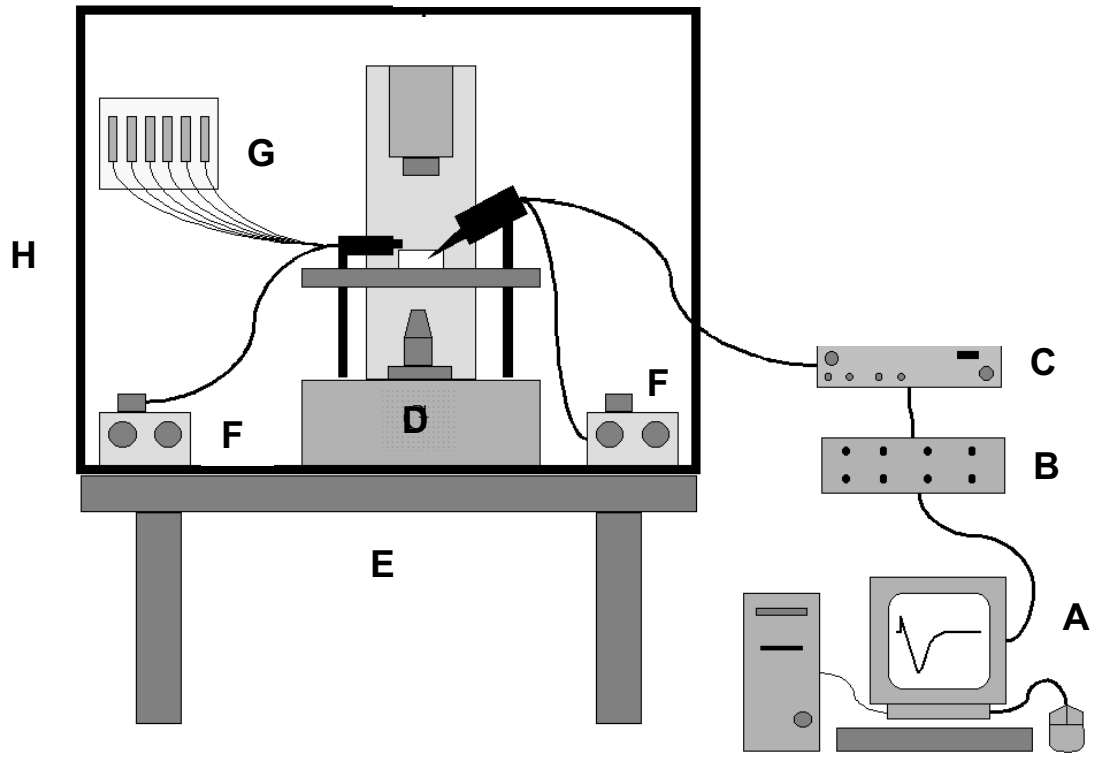


Figure 30 : Schéma de l'installation de patch-clamp.

A micro ordinateur, B convertisseur analogique/numérique et numérique/analogique, C amplificateur de patch clamp, D microscope inversé, E table anti-vibration, F micromanipulateurs, G système de périfusion, H cage de Faraday.

Lors de l'étude électrophysiologique des cellules, le milieu de culture contenant des protéines et facteurs de croissance peut perturber l'établissement du « seal ». Il est par conséquent rincé et substitué par une solution saline physiologique de préservation appelée PSS (Physiological Saline Solution) dont la composition est détaillée dans le **tableau 7**. Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Toutefois, à la place du PSS, nous avons utilisé parfois un autre milieu afin d'étudier le rôle des ions Na^+ dans l'invasivité des cellules. Pour cela nous avons fabriqué des milieux de culture qui convenaient aux expériences d'invasion (on y ajoutait du SVF) et aux expériences de patch clamp (sans SVF). Ces milieux, que nous avons nommés " Normo Na " et " Low Na", ont été obtenus à partir de DMEM sans NaCl, KCl ni $CaCl_2$ auquel nous avons rajouté 5,4 mM de KCl, 2mM de $CaCl_2$ et 110 mM de NaCl (Normo Na) ou 110 mM de chlorure de choline (Low Na).

Le milieu intrapipette (MIP) utilisé est une solution saline, conductrice, qui va "dialyser" le milieu intracellulaire et dont la composition doit par conséquent être la plus proche possible de celui-ci. Les compositions ioniques des cellules cancéreuses mammaires n'ayant jamais été décrites, nous avons utilisé une solution de composition classique pour ce type d'étude, à pH 7,2 (ajusté avec du KOH) et dont l'activité calcique a été contrôlée par l'établissement d'un tampon entre l'EGTA et l'apport de Ca^{2+} (**Tableau 8**).

Tableau 7 : Composition du PSS.

Composés	**concentration en mM**
NaCl	140
NaH_2PO_4	0,33
$CaCl_2$	2
$MgCl_2$	1
KCl	4
HEPES	10
D-(+)-Glucose	11,1

Tableau 8 : Composition du MIP.

Composés	**concentration en mM**
K-glutamate	125
KCl	20
$MgCl_2$	1
$CaCl_2$	0,37
Mg-ATP	1
HEPES	10
EGTA	1

C. Protocoles expérimentaux

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

Les courants sodiques dépendants du voltage sont des courants présentant des cinétiques d'activation et d'inactivation très rapides. Pour bien les caractériser il faut par conséquent se placer sur un intervalle de temps relativement court. De plus ces courants présentent une inactivation dépendante du voltage. Il faut alors partir d'un potentiel de maintien (« holding ») relativement hyperpolarisé (-100 mV dans notre cas) pour enregistrer l'activité maximale des canaux Na_V.

Le premier protocole utilisé est celui du « courant I_{Na} en fonction du voltage » et pour cela nous avons réalisé des dépolarisations par paliers de 5 mV, à une fréquence de 2 Hz, de –100 à +60 mV. Le créneau de dépolarisation dure 30 ms. Ce protocole permet d'observer l'amplitude maximale de I_{Na} en fonction du voltage imposé.

Afin de tester l'effet de différentes molécules ou de solutions déplétées en une espèce ionique, sur le courant sodique, nous avons utilisé des dépolarisations à –5 mV (voltage pour lequel l'amplitude maximale du courant est enregistrée), se succédant à une fréquence de 2 Hz. Ceci permet d'analyser l'amplitude maximale enregistrée en fonction du temps.

Comme nous l'avons vu, ces courants I_{Na} présentent une inactivation. Pour l'évaluer nous avons utilisé un protocole dit de « disponibilité » au cours duquel on fait suivre le protocole de dépolarisation à –5mV immédiatement après le protocole de courant-voltage. Plus le potentiel est dépolarisé lors du premier créneau, plus de canaux sodiques sont inactivés et par conséquent non disponibles pour le deuxième créneau. La courbe d'inactivation peut alors être construite en reportant l'amplitude maximale de I_{Na} lors du deuxième créneau, en fonction du voltage imposé par le premier protocole.

La courbe de conductance est déterminée en divisant le pic de courant $I_{Na,}$ obtenu lors du protocole I_{Na}-voltage, par la force électromotrice (E_m-E_{Na}). E_{Na} est le potentiel d'équilibre au sodium calculé d'après l'équation de Nernst et E_m le voltage appliqué à la membrane.
Les courbes de conductance et de disponibilité sont lissées par une fonction de Boltzmann du type :

$$Y=1/(1+\exp(V_{½}-V)^k)$$

Avec Y, le paramètre d'intérêt (conductance ou disponibilité), $V_{½}$ le voltage auquel la demi-conductance ou demi-inactivation se produit, k est le facteur de pente qui détermine les changements de conductance ou d'inactivation en fonction du voltage V.

Il faut noter que dans la configuration cellule entière du patch clamp, la qualité d'imposition du potentiel membranaire peut être amoindrie par deux types d'artefacts, les capacités de membrane et de pipette ainsi que la résistance d'accès électrique à la cellule. Ces deux paramètres peuvent être compensés grâce à une fonction de l'amplificateur ou par l'utilisation d'un protocole particulier. En effet, pour s'affranchir du courant capacitif généré par la pipette de patch et plus aisément enregistrer tout courant rapide, ou pour éliminer une composante de fuite non spécifique, il est possible d'utiliser une astuce expérimentale qui permet de soustraire toutes les composantes linéaires du test pulse : il s'agit du protocole P/n. Chaque protocole expérimental (créneau test) est précédé d'une succession de **n** créneaux dont l'amplitude (**a**) est égale au $n^{ième}$ de l'amplitude (**A**) du créneau test et de polarité opposée. Les courants mesurés pour chacun de ces n créneaux sont additionnés entre eux puis soustraits au courant mesuré pendant le créneau test. Il y a alors soustraction du courant capacitif induit par la pipette ainsi que de la fuite aspécifique. Le potentiel à partir duquel est appliquée la succession de créneaux doit être un potentiel pour lequel la membrane répond uniquement de façon passive : aucun canal ne doit s'activer et seules les composantes linéaires doivent être enregistrées.
Pour l'étude du courant sodique rapide, le protocole de soustraction est appliqué à partir de –120 mV, avec un n= 2.

Enfin, pour étudier l'ensemble des courants ioniques, ceux qui sont instantanés et ceux qui s'activent avec un léger retard, nous avons utilisé des protocoles courant-voltage, de dépolarisation par paliers de 10 mV de –100 à +100 mV à partir d'un potentiel de maintien de -70 mV, avec une fréquence de 0,5 Hz, et d'une durée de 500 ms.

III. Techniques de biologie moléculaire

A. Etude de la transcription des gènes par RT-PCR

1. Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits conformément aux recommandations du fabricant avec le kit Total RNA Isolation Nucleospin® RNA II (MACHEREY-NAGEL, France). Après trypsination, les cellules sont centrifugées à 700 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris et rincé avec 1 mL de PBS, et centrifugé 5 minutes à 10 000 x g. Le PBS est ensuite aspiré et chaque échantillon (1 à 2 millions de cellules) est repris dans le tampon lyse contenant de l'isothiocyanate de guanidium et du β-mercaptoéthanol (10 µL/mL). De l'éthanol à 70% (v/v) est ensuite ajouté au lysat. Le tout est mélangé, puis transféré sur une colonne de silice fixant préférentiellement les ARN. Apres un premier lavage, les ARN sont soumis à un traitement avec de la DNase pendant 15 minutes à température ambiante. Ce traitement permet d'éliminer l'ADN résiduel présent sur la colonne. La DNase est inactivée, puis la colonne est lavée deux fois avec un tampon contenant de l'éthanol. Après séchage par centrifugation, les ARN sont élués dans 50 µl d'eau pure garantie sans RNase.

Le dosage des ARN est ensuite réalisé par photométrie en comparant l'absorbance pour trois longueurs d'ondes : 260, 280 et 230 nm. En se plaçant à l'absorbance à 260 nm, la longueur d'onde d'absorbance maximale des acides nucléiques, nous pouvons déterminer la quantité d'ARN. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg/mL d'ARN totaux simple brin. L'absorbance à 280 nm reflète la quantité de protéines présentes dans l'échantillon (en effet certains acides aminés aromatiques absorbent à cette longueur d'onde). L'idéal est que le rapport 260/280 nm se rapproche de 2, traduisant ainsi une faible contamination protéique. Afin d'estimer une contamination par l'isothiocyanate de guanidium ou l'éthanol, nous utilisons le rapport 260/230 nm. Lorsque ce rapport est faible, il est nécessaire de récupérer les ARN par précipitation en présence d'acétate de sodium (2 M) et d'isopropanol et de les centrifuger, de les rincer avec de l'éthanol puis de les sécher sous vide, avant de les solubiliser dans de l'eau ultra-pure sans nucléase.

2. Transcription inverse

a) Principe

Cette technique permet de synthétiser le brin d'ADN complémentaire (ADNc) du brin d'ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse). Cet ADNc, qui comporte uniquement la séquence exonique du gène, est généralement destiné à être amplifié par PCR.

b) Méthode

Pour nos études, nous avons choisi d'utiliser une méthode qui réalise la transcription des ARN totaux en utilisant comme amorces des désoxyribonucléotides hexamèriques synthétisés au hasard (random primers pd$(N)_6$ 5'-Phosphate, ref 27-2166-01, Amersham Biosciences, UK). Ces oligonucléotides vont alors reconnaître différentes séquences et se fixer aléatoirement, mais de façon complémentaire, à tous les ARN présents dans le milieu réactionnel. La transcriptase inverse réalise alors la synthèse d'ADNc à partir de tous les ARN. Les ADNc seront alors récupérés sous forme de fragments simples brins après action de la RNAse H (**Figure 31**).

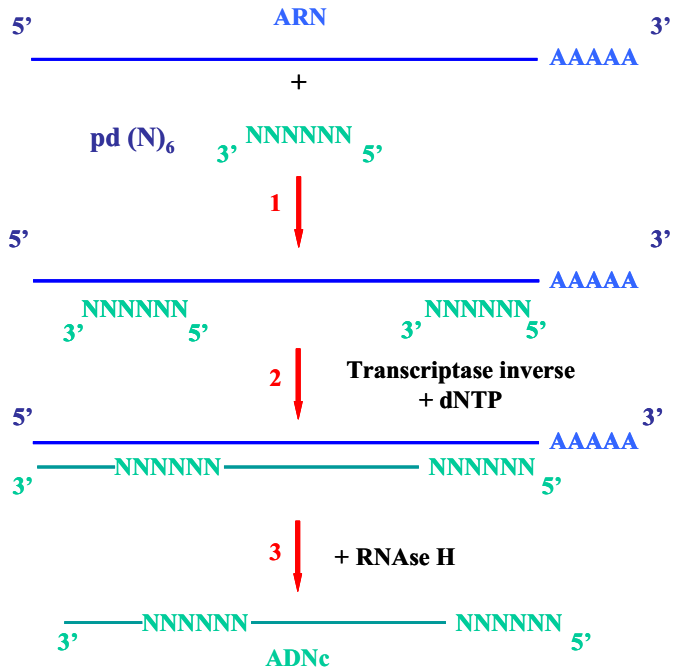


Figure 31 : Schéma de la transcription inverse d'ARNm en ADNc. **Etape 1 : appariement des amorces hexanucléotidiques pd(N)6 avec les séquences complémentaires de l'ARN. Etape 2 : transcription inverse de l'ARN en ADNc, en présence de la transcriptase inverse et des différents désoxyribonucléotides triphosphates. Etape 3 : digestion des ARN des hétéroduplexes ARN/ADN par la RNAse H.**

Nous avons utilisé le kit de transcription inverse « Ready-to-go You-prime First Strand Beads » (ref : 27-9264-01, Amersham Biosciences, UK) où les différents réactifs et enzymes : tampon, désoxyribonucléotides triphosphates, transcriptase inverse murine (FPLCpure^{TM}), RNAguard^{TM} (pour éviter la dégradation des ARN) sont contenus dans des billes, sous forme lyophilisée. Deux µg d'ARN totaux qsp 32 µL d'eau sans ribonucléase sont utilisés pour chaque transcription inverse. L'échantillon est dénaturé pendant 10 minutes à 65°C puis refroidi sur la glace pendant 2 minutes avant d'être mis en contact avec la bille réactionnelle et 0,2 µg (dans 1µL) d'amorces pd(N^6). La réaction de transcription inverse se fait à 37°C pendant une heure.

3. Réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction)

a) Principe

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR permet une importante amplification du nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN (l'amplicon), même si la quantité initiale est très faible (**Figure 32**). Cette technique est basée sur les propriétés de synthèse et d'initiation des ADN polymérases et les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température. Ainsi, grâce à des transitions de température (assurées par un thermocycleur) répétées de manière cyclique il est possible de contrôler l'activité des enzymes. Deux courtes séquences aux extrémités de la zone à amplifier doivent être sélectionnées et utilisées comme amorces lors de la réaction de polymérisation. La PCR s'effectue en 30 à 40 cycles, en général. Chaque cycle se fait en trois étapes. La première étape est une phase de dénaturation de l'ADN bicaténaire en deux brins d'ADN monocaténaire à la température de 95°C. La seconde étape consiste en une phase d'hybridation qui permet aux amorces de s'hybrider aux brins d'ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (60°C). L'amorce « sens » (forward), dont la séquence a été choisie sur le brin 5'→3', ira se fixer par complémentarité de bases sur le brin 3'→5' d'ADNc. Quant à l'amorce « anti-sens » (reverse), dont la séquence, complémentaire du brin 5'→3' d'ADNc, a été choisie sur le brin 3'→5'. Enfin après fixation des amorces, la troisième étape est une phase d'élongation qui permet à la polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice en allongeant le brin amorce (à une température qui est supérieure à celle de la renaturation de l'ADN matrice : 72°C). Ce brin est fabriqué à partir de désoxyribonucléotides (dNTPs) libres présents dans le

milieu réactionnel. A cette température, la majorité des enzymes sont dénaturées. C'est pourquoi nous utilisons une ADN polymérase qui reste active même à une température élevée : la Taq polymérase extraite de *Thermophilus aquaticus* (microorganisme vivant dans des sources hydrothermales).

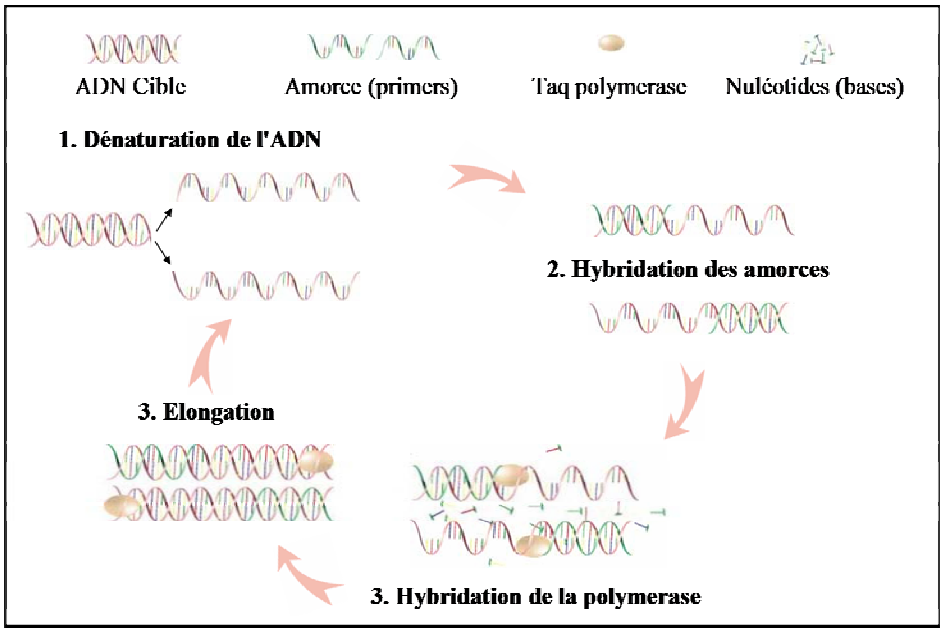


Figure 32 : Les trois étapes d'un cycle de PCR (tiré de http://www.adiagene.fr)

b) Méthode

Conception des amorces de PCR

Pour effectuer une réaction de PCR, il est nécessaire d'apporter un couple d'amorces oligonucléotidiques qui est spécifique de la séquence d'ADN à amplifier. La qualité de l'hybridation dépend de la quantité et de la qualité des amorces utilisées. Les séquences à amplifier sont sélectionnées à partir de la séquence complète de l'ARN (ou de son ADNc) transcrit à partir du gène d'intérêt disponible dans les banques de données (Genbank…), (NCBI : National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Grâce à la base de données ENSEMBL, il est possible de connaître l'enchaînement des différents exons d'un gène afin de déterminer une séquence à amplifier qui soit à cheval sur au moins deux exons, ainsi il sera possible de vérifier si l'ADNc a été contaminé par de l'ADN génomique (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview). Dans ce cas, le

fragment amplifié comprenant, en plus des séquences exoniques, les séquences introniques intercalées, serait plus grand.

Après avoir trouvé dans une banque de données la séquence du gène d'intérêt, il faut déterminer les séquences d'amorces les mieux adaptées pour cette réaction. Pour ce faire, nous avons, via le logiciel en ligne PRIMER 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) sélectionné les différents couples d'amorces. Différents critères sont utilisés afin d'obtenir les meilleures amorces possibles : taille du fragment à amplifier, taille des amorces (le plus souvent 20 désoxyribonucléotides (nt)), % de GC (au moins 50%), température de fusion (Tm) proche de 60°C.

La dernière étape consiste à vérifier plus précisément sur le site Blast (http://www.ncbi.nih.gov:80/BLAST/) que les amorces sélectionnées sont spécifiques afin d'éviter l'amplification de séquences identiques, mais appartenant à un autre gène que celui d'intérêt.

Réaction de polymérisation en chaîne

Pour réaliser les PCR de cette étude, nous avons utilisé le kit de PCR : puRETaq Ready-To-Go PCR Beads (ref : 27-9557-01, Amersham Biosciences, UK). Le milieu réactionnel, composé d'albumine sérique bovine (BSA), des quatre dNTP nécessaires à la synthèse du brin d'ADN, de 2,5 unités de puRETaq DNA polymérase^{TM} et du tampon (10 mM Tris-HCl de pH 9, 50 mM KCl et 1,5 mM $MgCl_2$), se présente sous forme de billes lyophilisées. Après avoir ajouté les deux amorces « sens » et « anti-sens », utilisées à la concentration finale de 0,5 µM, ainsi que 80 ng d'ADNc matrice le volume final est complété avec de l'eau qsp 25 µL. Lors des PCR, 35 ou 40 cycles sont réalisés par le thermocycleur Biometra Uno-Thermoblock (Biotron, Allemagne). Pour chaque cycle, la dénaturation est réalisée à 94°C pendant 30 s, l'hybridation des amorces à 60°C pendant 1 minute et l'élongation à 68°C pendant 2 minutes. Une fois la PCR terminée, les fragments d'amplification sont conservés à 4°C.

Migration par électrophorèse et révélation des produits de PCR

Une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée afin de visualiser les fragments d'ADN qui ont été amplifiés par PCR. Le gel à 2,5% d'agarose (ref : V3121, Promega, USA) est préparé dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE, pH 8,2-8,4, ref : V4281, Promega, USA).

Afin de pouvoir visualiser les produits de PCR, nous utilisons du bromure d'éthidium (BET, Ethidium Bromide Solution, ref : H5041, 10 mg/mL, Promega, USA), un intercalant de l'ADN simple ou double brin. Il est mélangé au gel d'agarose à la concentration de 0,5

µg/mL. L'utilisation d'un marqueur de taille « 100 bp DNA » (ref : G2101, Promega, USA) est indispensable pour vérifier que la taille des fragments d'ADN amplifiés est bien celle attendue. Pour suivre la migration des échantillons, un marqueur de dépôt « blue/orange loading dye » (ref : G1881, Promega, USA) est ajouté à chaque échantillon déposé. L'électrophorèse est réalisée en tampon TAE, à voltage constant (70 volts) pendant une heure environ. La visualisation des fragments d'ADN amplifiés est réalisée sous UV par une caméra (GelDoc 2000, BioRad, France). La taille des fragments est déterminée par rapport aux marqueurs de taille grâce au logiciel Quantity One (Biorad, France).

B. Quantification des ARN : PCR quantitative en temps réel

1. Principe

Le principe de la Q-PCR consiste à détecter et quantifier un rapporteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR, et donc à la quantité initiale de matrice. Il s'agit ici d'une méthode quantitative qui permet d'atteindre une valeur absolue ou relative, et non plus approximative, de la quantité initiale de matrice. Pour que cette quantification puisse avoir lieu (en tout début de phase exponentielle c'est-à-dire dès l'apparition du produit d'amplification), les mesures sont réalisées à chaque cycle de la PCR, d'où le terme « temps réel ». La détection des amplicons par fluorescence repose sur l'utilisation d'un intercalant de l'ADN : le SYBR® green. Ce composé fluorescent a une intensité d'émission 2500 fois plus forte lorsqu'il est intercalé dans de l'ADN double brin (λexc : 494 nm, λem : 521 nm). Sa présence dans le milieu réactionnel ne modifie pas l'efficacité de la PCR. La mesure de fluorescence est effectuée en fin de phase d'élongation quand la totalité de l'ADN synthétisé est sous forme de double brin. Le cycle seuil (Ct : Threshold cycle) correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour que le signal mesuré dépasse le bruit de fond. Ainsi dans le cas de deux échantillons X et Y, si CtX < CtY alors Qo(X) > Qo(Y) (avec Qo : quantité initiale de matrice) (**Figure 33**).

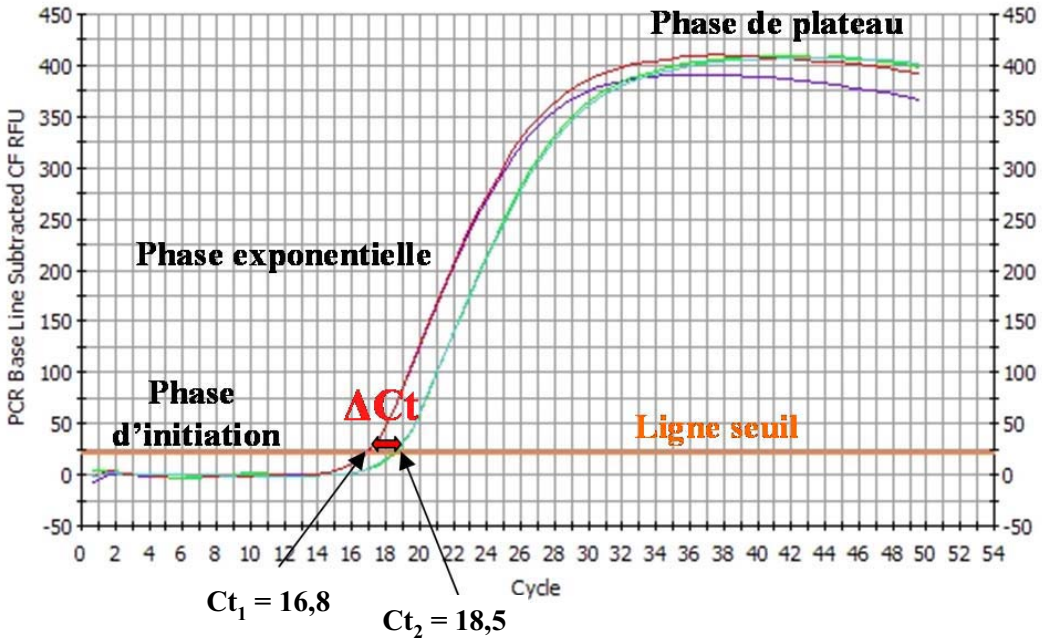


Figure 33 : Courbes de fluorescence détectée au cours de l'amplification

La fluorescence est exprimée en unités relatives de fluorescence (RFU). Trois phases peuvent être distinguées au cours d'une réaction de PCR quantitative. La phase d'initiation pendant laquelle l'intensité de fluorescence est très faible. La phase exponentielle, où après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle est appelé cycle seuil (Ct). Il correspond au nombre de cycles pour lequel l'intensité de fluorescence diffère du bruit de fond (ligne seuil). Le cycle seuil est en théorie directement lié à la quantité de matrice (ADNc issu de l'ARNm) initialement présente dans l'échantillon. La phase de plateau correspond à la saturation de la réaction causée par une accumulation des produits de PCR. Le ΔCt est utilisé pour estimer de façon relative les quantités d'ARNm cible par rapport à un témoin.

L'utilisation d'une courbe étalon, établie avec une PCR réalisée sur une gamme de dilutions d'une quantité ADNc définie (amplicons de grande taille), permet de déterminer l'efficacité (E) des couples d'amorces (**Tableau 9**). Dans cette méthode, l'intercalant n'a pas de spécificité pour la molécule cible. Ainsi, pour vérifier que la fluorescence mesurée correspond bien à la détection de l'amplicon recherché, une courbe de fusion est réalisée à la fin de la PCR. Dans le cas d'une contamination, on voit apparaître plusieurs pics et la surface des pics obtenus en représentant dF/dT (variation de la fluorescence/variation de la température) en fonction de T permet d'estimer la part de la fluorescence due à la quantité de l'amplicon recherché.

2. Méthode

Les cellules sont trypsinées afin de procéder à l'étape d'extraction des ARN totaux. Les ARN extraits sont ensuite dosés par une lecture au spectrophotomètre. On utilise 2 µg d'ARN totaux pour la transcription inverse en ADNc. A ce stade les échantillons peuvent être utilisés pour la PCR quantitative. L'efficacité des amorces est déterminée à partir de la PCR quantitative d'une gamme d'ADNc obtenue par dilution successive d'une quantité d'ADNc connue.

La PCR quantitative est réalisée dans des plaques de 96 puits. Chaque puits contient 25 µL d'un mélange de 10 µL d'une solution d'ADNc totaux à la concentration de 10 ng/µL, de 1 µL de chaque amorce « sens » (amorces « forward ») et « anti-sens » (amorces « reverse ») (**Tableau 9**), à 12,5 pmol/µL, et de 13 µL de tampon SYBR® green (sonde fluorescente SYBR® green I, ADN Taq polymérase Platinum®, $MgCl_2$ à 3 mM, uracil-DNA glycosylase et des désoxyrybonucléotides triphosphates, Invitrogen). Les blancs, obtenus avec le même mélange que ci-dessus mais sans ADNc, permettent de vérifier que la PCR n'amplifie pas de l'ADN contaminant. La PCR quantitative est effectuée grâce au système iCycler (BioRad, France). Le programme d'amplification effectué sur 35 à 40 cycles : 15 s à 95°C (étape de dénaturation) puis 30 s à 60°C (étape d'hybridation des amorces et extension). La quantification relative, basée sur la différence des Ct (ΔCt) permet d'évaluer l'influence des différentes molécules à tester (TTX, siRNA, acides gras, etc…) sur les niveaux d'ARN (**Livak *et al.*, 2001**). La première étape consiste à utiliser le Ct d'un gène de référence, codant pour les ARN ribosomaux 18S. Ainsi, en calculant le $\Delta Ct = Ct_{\text{(gène cible)}} - Ct_{\text{(gène de référence)}}$, il est possible de normaliser les différences liées à la quantité d'acides nucléiques pipetée et déposée dans les puits. La comparaison des ΔCt entre les cellules traitées et les cellules témoins permet de déterminer le ΔΔCt = ΔCt (cellules traitées) - ΔCt (cellules témoins). Le rapport du taux d'ARN (Q) entre les cellules traitées et les cellules témoins est donné par la formule suivante : $Q = (1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$. Si la quantité du gène cible n'est pas affectée par l'acide gras testé alors ΔΔCt = 0 et Q = 1. Si le traitement provoque une surexpression du gène par rapport à la condition témoin, alors Q a une valeur supérieure à 1. A l'inverse lorsqu'il y a sous-expression, Q est inférieur à 1.

Tableau 9 : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés en PCR et Q-PCR et taille attendue des fragments amplifiés.

Gènes	Produits de gène	Amorces « Forward »	Amorces « Reverse »	Taille fragment amplifié (nt)
SCN5A	$\alpha Na_V1.5$	CACGCGTTCACTTTCCTTC	CATCAGCCAGCTTCTTCACA	208
SCN5A	$\alpha Na_V1.5$	CTTCACCGCCATTTACACCT	GAAGCGCTTTTCCTTCTCCT	814
SCN1B	β1	GAAAACTACGAGCACAACACCA	GGCAGTATTGCTTTACCCATCA	510
SCN2B	β2	TGACCCACTCTCTTCCATCC	GGTCCTCTCTGAAGCCACTG	216
SCN3B	β3	TCAACGTCACTCTGAACGACTC	CATGTCACACTGCTCCTGTTCT	346
SCN4B	β4	ACAGCAGTGACGCATTCAAG	CACATGGCAGGTGTATTTGC	188
CTSB	Cath. B	ACAGCCCGACCTACAAACAG	CCAGTAGGGTGTGCCATTCT	239
CTSB	Cath. B	GATCTGCATCCACACCAATG	GCCACCACTTCTGATTCGAT	621
CTSK	Cath. K	CCTTGAGGCTTCTCTTGGTG	GGGCTCTACCTTCCCATTCT	164
CTSK	Cath. K	TTCTGCTGCTACCTGTGGTG	AAGGCATTGGTCATGTAGCC	541
CTSL	Cath. L	AGGAGAGCAGTGTGGGAGAA	TGGGCTTACGGTTTTGAAAG	160
CTSL	Cath. L	ACAGTGGACCAAGTGGAAGG	CAGGCCTCCATTATCCTGAA	508
CTSS	Cath. S	TCTCTCAGTGCCCAGAACCT	GCCACAGCTTCTTTCAGGAC	248
CTSS	Cath. S	TTGCCTGATTCTGTGGACTG	TCACCATAGCCAACCACAAG	518
CSTB	Stef. B	TAGGAGAGCGTGGCTGTTTT	TGATGCTCCCTCTTCTGTCC	128
CSTB	Stef. B	TCACGCACTTTATGCTCTGG	AGAGGTACGATCTCGGCTCA	749
CST3	Cyst. C	GATCGTAGCTGGGGTGAACT	CCTTTTCAGATGTGGCTGGT	115
CST3	Cyst. C	TCTATCTAGCTCCAGCCTCTCG	GGGGCTATGAGAAGCAAGAA	710
CST6	Cyst. M	CTTTGCCATCAGCGAGTACA	GGAACCACAAGGACCTCAAA	141
CST6	Cyst. M	GTCGCATTCTGCCTCCTG	CCTCGGGGACTTATCACATC	421
PRKCA	PKC α	CCAAGGAGGCTGTTTCTGTC	GTTCTCTGCTCCTTTGCCAC	191
PRKCB	PKC β	CCGCAGCAAACACAAGTTTA	AGGCTGGGAACATTCATCAC	156
PRKCG	PKC γ	GGACAATGTGATGCTGGATG	AGGACCACCAATCGACAGAC	173
PRKCD	PKC δ	CAGTCTATGCGCAGTGAGGA	TGCATTTGTAGCCTTGCTTG	184
PRKCE	PKC ε	CATCAAGGTGTTGGGCAAA	CAGTCCACGTCATCATCCTG	126
PRKCH	PKC η	GGGAGTTTTGGGAAGGTGAT	GGGTCTGAAAGCAGCAGAAC	187
PRKCQ	PKC θ	CCCGACCTTCTGTGAACACT	CTCTTAAGCAGCGAGCCTGT	194
PRKCI	PKC ι	TACGGCCAGGAGATACAACC	TCGGAGCTCCCAACAATATC	169
PRKCZ	PKC ζ	TGTCCGGGAGAAGACAAATC	GACCAGCAGTTTGCAGTTGA	186

Les fragments de grande taille (cathepsine (Cath), stéfine (Stef), cystatine (Cyst) et $\alpha Na_V1.5$) servent à établir une gamme quantitative d'ADN cible utilisée lors de la Q-PCR et permettent de déterminer l'efficacité des amorces utiliser pour la quantification des ARN des gènes d'intérêt.

C. Etude des protéines par western-blot

1. Principe

La technique de western blot permet d'étudier de façon ciblée les protéines présentes dans les échantillons. Elle est basée sur la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps (Ag-Ac). Les anticorps constituent des sondes moléculaires capables de fixer une substance antigénique. Les protéines extraites à partir d'un échantillon cellulaire sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Elles sont ensuite transférées sur une membrane (nitrocellulose ou fluorure de polyvinylidène : PVDF). L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire va permettre la détection spécifique de la protéine d'intérêt. La reconnaissance de l'Ac primaire par un Ac secondaire couplé à une enzyme va permettre de visualiser une bande correspondant à la protéine recherchée.

2. Méthode

a) Préparation des lysats cellulaires et détermination de la concentration protéique

L'extraction de l'ensemble des protéines cellulaires a été réalisée en utilisant soit un tampon de lyse contenant du SDS, soit en utilisant un autre tampon de lyse contenant du Triton X-100 et du Nonidet P-40. Dans le premier cas, les protéines sont extraites à l'aide d'une solution contenant 5% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) en présence d'inhibiteurs de protéases (Cocktail inhibiteur de protéases, Ref P2714 et PhenylMethylSulfonyl Fluoride, Ref P7626, Sigma, France), sur des cellules recueillies par trypsination et centrifugation. Les échantillons sont ensuite aspirés et refoulés plusieurs fois avec une seringue de 1 mL et une aiguille fine (type aiguille à insuline) de façon à bien fragmenter les filaments d'ADN qui, du fait de leur viscosité en longs filaments, perturbent les dépôts sur gel.

L'autre méthode consiste à reprendre un culot cellulaire avec un tampon de lyse contenant (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,25% déoxycholate de sodium, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Cocktail inhibiteur de protéases) et à homogénéiser la suspension pendant 1 h à 4°C. Les lysats cellulaires sont alors centrifugés à 16000 x g pendant 10 min afin de se débarrasser des débris.

Dans le cas de l'étude de protéines secrétées comme les cathepsines, les milieux de culture ont été préalablement centrifugés afin d'éliminer les cellules flottantes puis concentrés par ultracentrifugation sur colonnes Amicon Ultra-4 (Millipore, France).

Pour pouvoir étudier l'effet d'un traitement sur l'expression protéique, il est nécessaire de déposer toujours la même quantité de protéines pour tous les échantillons. Il est donc nécessaire de réaliser un dosage protéique. La technique que nous avons utilisée est dérivée de la méthode du biuret. Elle est basée sur la réduction des ions cuivriques Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^{+} lors de la réaction avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin. L'ajout d'acide bicinchoninique (BCA) va chélater les ions Cu^{+} et donner un complexe soluble de couleur pourpre (BCA Protein Assay Kit, ref : 23227, Interchim, France). Cette méthode à l'avantage d'être sensible et rapide et de ne pas interférer avec les concentrations de détergents utilisés dans les tampons de lyse (SDS, triton). On dépose 25 µL d'échantillon avec 200 µL de mélange réactionnel BCA dans une plaque 96 puits. Les plaques sont ensuite placées à 37°C pendant 30 minutes puis lues au spectrophotomètre (Spectra Max 190, Molecular Devices, USA) à la longueur d'onde de 562 nm. La concentration protéique des échantillons est déterminée à partir de l'équation de la droite issue de la gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin).

b) Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les protéines, lorsqu'elles sont chargées négativement par du SDS, migrent sous l'effet d'un courant électrique à l'intérieur d'un gel de polyacrylamide (6, 10 ou 12%, en fonction de la taille des protéines à étudier). Avant de déposer les échantillons dans les puits du gel, ils sont placés soit pendant 30 minutes à 37°C, soit bouillis pendant 3 minutes, en présence de bleu réducteur (contenant Tris, Glycérol, SDS, bleu de bromophénol et β-mercapto éthanol ou DTT). Le dépôt d'un marqueur étalon de poids moléculaire coloré (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad, USA) va permettre de repérer la protéine d'intérêt par sa masse molaire relative.

La migration est effectuée à ampérage constant (30 mA par gel), dans du tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Composition du tampon d'électrophorèse Tris-glycine-SDS utilisé pour la migration (pH 8,3).

Composés	Concentration
Tris	25 mM
Glycine	190 mM
SDS	0,1 %

c) Electrotransfert des protéines sur membrane de PVDF

Après leur migration sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon P transfert membrane, Millipore, USA) dans un module de transfert Xcell II^{TM} Blot Module (Invitrogen, France) ou Mini Trans-Blot Cell (BioRad, USA), contenant du tampon de transfert (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Composition du tampon de transfert (pH 8,3)

Composés	Concentration
Tris	25 mM
Glycine	190 mM
Méthanol	20 %

Pour le transfert, on dispose successivement, de la cathode vers l'anode, une ou deux éponges et une feuille de papier Whatman imbibées de tampon de transfert, le gel, la membrane de PVDF préalablement activée dans du méthanol, une deuxième feuille de papier filtre, et une ou deux éponges imbibées. Une fois le montage terminé, la cassette est placée dans la cuve de transfert et remplie de tampon de transfert. Le transfert est réalisé à ampérage constant, à 250 mA pendant 150 minutes (ou 350 mA pendant 90 minutes pour le module BioRad).

La membrane de PVDF est ensuite incubée, sous agitation, toute la nuit à une température de 4°C (ou pendant 2 heures à température ambiante) dans une solution de TTBS (Tween 20 Tris-Buffered Saline) comprenant 5% de lait écrémé afin de saturer les parties de la

membrane de PVDF n'ayant pas fixé de protéines lors du transfert et ainsi éviter la fixation ultérieure non spécifique de l'anticorps primaire (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Composition du TTBS (pH 7,3)

Composés	Concentration
Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20	0,10%

Après 5 lavages de 5 minutes dans du tampon TTBS, la membrane est incubée environ deux heures à température ambiante, sous agitation, dans une solution de TTBS comprenant 2% de lait écrémé et les anticorps primaires (**Tableau 13**). La membrane est ensuite rincée (5 lavages de 5 minutes avec du tampon TTBS) et incubée pendant 1 heure, sous agitation à température ambiante, dans une solution contenant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP), sauf dans le cas des anticorps primaires anti-β-Actine qui sont déjà couplés à la HRP. Les anticorps secondaires se fixent spécifiquement aux anticorps primaires (**Tableau 14**). Après 5 lavages de 5 minutes dans du tampon TTBS, la membrane est récupérée pour la révélation des protéines d'intérêt à l'aide du kit ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Le principe utilisé par ce kit de révélation est la catalyse de la réaction d'oxydation du luminol par la peroxydase, en conditions alcalines, en présence de peroxyde d'hydrogène, ce qui est à l'origine d'une réaction de chimiluminescence détectable en autoradiographie. Le kit de révélation ECL est constitué de deux réactifs (A et B) qu'il faut mélanger. La membrane de PVDF doit alors être placée dans ce mélange pendant une minute exactement. La membrane est alors égouttée puis placée entre deux films plastiques dans une cassette de révélation. Les étapes qui suivent sont réalisées en chambre noire. Un film d'autoradiographie (Kodak® BioMax™ light film, Sigma Aldrich, France) est déposé, pendant une durée contrôlée, au contact de la membrane. Pour la révélation, le film est placé dans une développeuse (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, UK). La révélation peut également se faire manuellement (utilisation des réactifs Kodak® processing chemicals for autoradiography films, Sigma Aldrich, France) Les films développés sont ensuite disposés sous une caméra

(GelDoc 2000, Biorad, France), ou scannés, et les bandes sont analysées à l'aide du logiciel Quantity One 4.0.1 BioRad, France).

Tableau 13 : Récapitulatif des anticorps primaires utilisés pour l'étude en western blot des protéines d'intérêt.

	ANTICORPS PRIMAIRES			
Protéines d'intérêt	Noms des Anticorps primaires	Espèces	Dilutions	Fournisseurs et Références
Canaux sodiques Na_v	IgG monoclonales Pan-Na_v	Souris	1/200	Sigma®, USA, S8809
Cathepsine B	IgG polyclonales anti-Cathepsine B	Lapin	1/1000	Fitzgerald, USA, 20-CR71
Cathepsine S	IgG polyclonales anti-Cathepsine S	Lapin	1/1000	Calbiochem®, VWR International, France, 219384
Cathepsine K	IgG polyclonales anti-Cathepsine K	Lapin	1/1000	Calbiochem®, VWR International, France, 219386
Cathepsine L	IgG polyclonales anti-Cathepsine L	Lapin	1/1000	Calbiochem®, VWR International, France, 219387
Cavéoline 1	IgG monoclonales anti-Cavéoline 1	Souris	1/1000	BD Biosciences, France, 610406
β-Adaptine	IgG monoclonales anti-Adaptine β	Souris	1/2500	BD Biosciences, France, 610382
Echangeur NHE 1	IgG monoclonales anti-NHE1	Souris	1/2000	Chemicon® International, Millipore, France, MAB3140
PKC α	IgG monoclonales anti- PKC α	Souris	1/2000	BD Biosciences, France, 610107
PKC δ	IgG monoclonales anti-PKC δ	Souris	1/2000	BD Biosciences, France, 610397
PKC ε	IgG monoclonales anti- PKC ε	Souris	1/1000	BD Biosciences, France, 610085
PKC ι	IgG monoclonales anti- PKC ι	Souris	1/1000	BD Biosciences, France, 610175
GAPDH	IgM monoclonales anti- GAPDH	Souris	1/5000	Sigma®, USA, G8795
β-Actine	IgG monoclonales anti-β-Actine couplés à la HRP	Souris	1/2000	TEBU-BIO, France, Sc-47778

Tableau 14 : Récapitulatif des anticorps secondaires utilisés en western blot.

ANTICORPS SECONDAIRES			
Noms des Anticorps secondaires	Espèces	Dilutions	Fournisseurs et Références
Ac secondaires Anti-IgG de souris couplés à la HRP	Chèvre	1/5000	TEBU-BIO, France, Sc-2004
Ac secondaires Anti-IgG de souris couplés à la HRP	Chèvre	1/3000	Southern Biotech, USA, OB1031-05
Ac secondaires Anti-IgG de lapin couplés à la HRP	Chèvre	1/5000	TEBU-BIO, France, Sc-2005

D. Transfection cellulaire transitoire par ARN interférents (siRNA)

1. Principe

L'utilisation d'ARN interférents permet d'inhiber spécifiquement l'expression d'une protéine. Les "small interfering RNA" (siRNA) sont de courtes séquences d'ARN double brin (20-25 nucléotides) ciblant spécifiquement un ARN messager (ARNm). 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 de 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.

2. Méthode

Un ensemble de trois siRNA dirigés contre l'ARNm de $Na_V1.5$ (Santa Cruz sc-4260, Tebu Bio, France) a été utilisé pour transfecter les cellules MDA-MB-231. Un siRNA ne ciblant aucun gène connu (réf sc-37007) a été utilisé comme contrôle. Pour permettre "l'entrée" des siRNA à l'intérieur de la cellule, il convient de s'affranchir de la barrière créée par la membrane plasmique et d'utiliser un agent transfectant : la Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, France). La lipofectamine est un lipide cationique qui va encapsuler les siRNA (par complémentarité de charges), fusionner avec la membrane plasmique de la cellule et libérer les siRNA dans le milieu intracellulaire.

Les transfections ont été réalisées dans des plaques 6 puits (Corning Costar®, Ref 3516, Corning, USA). Pour cela on prépare d'abord une solution de DMEM sans SVF contenant les siRNA (pour une concentration finale à 20 nM) et la lipofectamine (0,2% du volume final). Après 20 minutes d'incubation, pour que les complexes lipofectamine-siRNA se forment, les cellules en suspension sont ajoutées au mélange. Les cellules sont alors laissées 24 h à 37°C, avant d'être récoltées pour être utilisées pour les différentes expériences (patch-clamp, tests d'invasion, etc…).

L'efficacité des siRNA sur la quantité d'ARNm d'intérêt est bien entendu vérifiée en RT-PCR quantitative.

IV. Etude de l'activité des cathepsines à cystéine

L'étude de l'activité des cathepsines a été réalisée par l'utilisation de différents substrats fluorigéniques plus ou moins spécifiques d'un type de cathepsines, associés à plusieurs inhibiteurs enzymatiques inhibiteurs.
Dans un premier temps, et de façon à déterminer l'activité des cathepsines présentes dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, nous avons récupéré les cellules totales cultivées sur Matrigel™ par grattage (pour éviter l'utilisation de la trypsine, une sérine-protéase). Nous nous sommes alors intéressés à mesurer l'activité des cathepsines dans les lysats cellulaires et dans les surnageants de culture ainsi qu'au titrage des cathepsines secrétées sous forme liée à la membrane.

Nous avons donc réalisé un lysat cellulaire total, dans une solution tamponnée à pH 5,5 (pour conserver l'activité enzymatique). Le lysat cellulaire a été obtenu par 7 cycles de congélation dans l'azote liquide / décongélation au bain marie. Pour l'étude des cathepsines dans les surnageants de culture, les cellules ont été cultivées sur Matrigel™, puis laissées 24 heures dans un milieu de culture sans SVF. Les surnageants ont ensuite été récupérés et concentrés (au moins 10 fois), à l'aide de colonnes Microcon® (Microcon Ultracel YM-10, Millipore, France) ou Amicon® (Amicon Ultra-4, Ultracel - 10k, Millipore, France). Pour le titrage des cathepsines secrétées sous forme liée à la membrane, des suspensions de cellules entières ont été utilisées.

Les échantillons (lysats, surnageants concentrés ou suspensions cellulaires) ont alors été dilués dans une solution tamponnée à pH 5,5 contenant de l'acétate de sodium (0,1 M), 2 mM d'EDTA (bloque l'activité de toutes les MMP) et 2 mM de DTT. Dans les surnageants, on retrouve essentiellement les pro-formes inactives des cathepsines à cystéine dont la maturation dépend en réalité du microenvironnement dans lequel elles sont sécrétées. Aussi afin de pouvoir estimer l'activité potentielle des cathepsines dans les surnageant, on réalise une incubation préalable avec du sulfate de dextran (40 µg/mL), qui va permettre de "démasquer" le site actif et rendre possible l'accès au substrat.

Différents substrats ont été utilisés pour l'identification des différentes activités de type cathepsines ainsi que différents inhibiteurs (**Tableaux 15 et 16**). Le E-64 est un bloqueur à spectre large, qui bloque toutes les cathepsines. Les substrats ont été développés initialement par Alan Barett, dans les années 1980 (Barrett, 1980), et sont maintenant commercialisés chez Calbiochem.

Les substrats utilisés pour l'étude des endopeptidases répondent tous à la structure suivante :

z-$(X)_n$-R-AMC

Avec : z = un groupement benzyloxycarbonyle

$(X)_n$ = n acides aminés avec n=1 ou 2

R= un résidu arginine

AMC = un groupement 4-méthyl-7-coumarylamide.

En présence d'une activité protéolytique de type cathepsine, il y a libération du groupement AMC et augmentation de la fluorescence émise à 460 nm, lors d'une excitation à 350 nm.

Tableau 15 : Récapitulatif des différents substrats fluorigéniques utilisés pour l'étude des différentes cathepsines.

Substrats Fluorigéniques	**Gammes de concentration des substrats (µM)**	**pH des tampon**	**Spécificité des protéases étudiées**
z-FR-AMC	5-40	5,5-6	Cathepsines endopeptidasiques (B, L, S, K)
z-RR-AMC	5-40	5,5-6	Cath. B
z-LR-AMC	5-40	5,5-6	Cath. S > Cath. K > Cath. B
z-GPR-AMC	5-40	5,5-6	Cath. K
z-LR-AMC	5-40	7-7,5	Cath. S
R-AMC	5-40	5,5-6	Cath. H

Ainsi le substrat z-FR-AMC est un substrat qui autorise, à pH 5,5-6, l'étude de l'activité de l'ensemble des cathepsines endopeptidasiques. En revanche, il ne permet pas l'étude des cathepsines qui clivent aux extrémités amino- ou carboxyterminales. Pour l'étude de l'activité de la cathepsine H, qui est une aminopeptidase, nous avons utilisé un substrat spécifique où une arginine en N-terminal est associée au groupement AMC : **H_2N-R-AMC**.

A ce pH acide, les sérine-protéases sont inactivées, et en présence d'EGTA les MMP le sont aussi.

Il est à noter que ce substrat peut être utilisé pour doser l'activité de la majorité des sérine-protéases, à un pH de 8. Dans ce cas, le tampon utilisé contient du Tris, du NaCl, du DTT et de l'EDTA. Un pH alcalin est un pH favorable à l'activité des sérine-protéases et défavorable à celle des cystéines-protéases qui vont alors s'inactiver, à l'exception de la cathepsine S qui conserve une légère activité. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux activités des cathepsines B, L, S, K et H.

Il est possible de bloquer toute l'activité cystéine-protéase (cathepsines) à l'aide de l'inhibiteur E-64 (100 µM) et de bloquer toute l'activité sérine-protéase avec du PMSF (100 µM). Il existe aussi des bloqueurs qui, dans une certaine gamme de concentrations, sont spécifiques d'une cathepsine en particulier (**Tableau 16**).

L'utilisation d'une gamme de concentrations d'E64 (de 0 à 100 nM) et de CA-074 (de 0 à 25 nM) nous a permis d'effectuer le titrage, respectivement des cathepsines totales et de la cathepsine B, secrétées sous forme liée aux membranes, dans les suspensions cellulaires.

Tableau 16 : Récapitulatif des différents inhibiteurs de cathepsines à cystéine utilisés.

Protéases	**Inhibiteurs**	**Concentrations**	**Références (Calbiochem)**
Cystéine-protéases	E-64	100 µM	324890
Cathepsine B	CA-074 (Cathepsin B Inhibitor III)	25 nM	205530
Cathepsine K	Cathepsin K Inhibitor II (z-L-NHNHCONHNH-LF-Boc)	100 nM	219379
Cathepsine L	Cathepsin L Inhibitor VI	200 nM	219495
Cathepsine S	Cathepsin S Inhibitor (z-FL-COCHO)	2 nM	219393

V. Mesure du pH cellulaire par microspectrofluorimétrie

Le pH intracellulaire comme le pH du microenvironnement, voire du "nanoenvironement", c'est-à-dire au niveau de l'interface cellule-matrice, ont un rôle très important dans les mécanismes d'invasivité des cellules cancéreuses. Plusieurs techniques ont été mises au point pour mesurer le pH cellulaire comme par exemple des microélectrodes sensibles aux protons ou bien des sondes fluorescentes. Pour ce qui est de notre étude, les variations de pH cellulaire ont été mesurées grâce à l'utilisation de deux sondes fluorescentes : la sonde 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM, Molecular Probes, USA) (Rink *et al.*, 1982) a été utilisée pour la mesure du pH intracellulaire (pHi), et la sonde N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)- 1,2-dihexadecanoyl- sn-glycero-3-phospho-ethanolamine (DHPE couplée à la fluorescéine, Molecular Probes, USA) (Serowy *et al.*, 2003) pour mesurer le pH périmembranaire (pHm) au niveau de la face extracellulaire.

A. Mesure du pH intracellulaire

La sonde BCECF dérivée de la fluorescéine est utilisée comme indicateur du pH intracellulaire. La molécule de BCECF pénètre dans les cellules sous sa forme liposoluble acétoxyméthyl ester (BCECF-AM). Alors que la structure chimique ($C_{17}H_{20}O_{11}$) du BCECF est caractérisée par l'existence de trois groupes carboxyliques externes responsables de l'augmentation de son hydrophilie, la forme BCECF-AM ($C_{42}H_{40}O_{21}$) n'est pas soluble dans l'eau mais dans des solvants comme l'acétone ou le DMSO. Cette structure est électroneutre, hydrophobe et liposoluble, ce qui permet son passage à travers la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule l'action d'estérases non spécifiques permet la libération du BCECF suite à une réaction d'hydrolyse des groupements acétoxyméthyl ester. Le BCECF redevient alors une molécule polyanionique et hydrophile et ses propriétés l'empêchent de quitter la cellule.

Le BCECF présente un pic d'émission vers 530 nm. L'intensité de fluorescence de la sonde dépend de la valeur du pH lorsque la sonde est excitée à environ 490 nm. 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 et la fluorescence augmente.
L'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation (490 nm) ne permet pas d'obtenir un signal d'émission indiquant que les variations de fluorescence enregistrées sont uniquement liées à un changement de pHi. La diminution d'intensité de fluorescence peut être le résultat d'une photodestruction (photo-bleaching) de la sonde à la suite d'excitations répétées, ou une conséquence directe de la diminution de la concentration du BCECF. Afin de n'enregistrer que des variations de fluorescence dues à des variations de pH, on utilise une seconde longueur d'onde d'excitation, à 400 nm. L'intensité de fluorescence, est à cette longueur d'onde, indépendante du pH et reflète la concentration intracellulaire de sonde. De ce fait, l'utilisation du rapport des fluorescences (R = F490/F400) permet de s'affranchir de toutes variations de fluorescence indépendantes du pH. Le signal lié au bruit de fond est bien entendu soustrait à ces valeurs.

Les cellules qui ont été ensemencées dans une boite de Pétri 35 mm à fond de verre, à une densité qui permet d'avoir des cellules isolées, sont incubées dans du PSS (*cf.* tableau 7) contenant 5 µM de BCECF-AM, pendant 45 min à température ambiante, et à l'abri de la lumière pour éviter la destruction du BCECF. Puis elles sont mises en présence d'une solution PSS sans BCECF pendant 15 à 20 min, ce qui laisse le temps aux cellules d'hydrolyser le groupement AM de la sonde. La boite est ensuite placée sur la platine inversée d'un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, France). Les mesures sont réalisées à température ambiante, puisque tout comme pour les expériences de patch clamp, le microscope n'est pas équipé d'une chambre thermostatée. Il est toutefois possible que les variations de pH observées en fonction des différentes conditions soient alors sous-estimées, puisqu'à une température inférieure à 37°C, l'activité de certaines protéines membranaires peut être diminuée ; c'est le cas en particulier de l'échangeur sodium-proton et du co-transporteur sodium-bicarbonate (Ch'en *et al.*, 2003). L'acquisition commence après la sélection dans les champs observés d'une cellule isolée, en diminuant l'ouverture du diaphragme de champ. La source d'excitation lumineuse provient d'une lampe Xénon 75-W et un monochromateur (Cairn Optoscan, UK) permet d'exciter alternativement la sonde aux longueurs d'ondes d'intérêt (400 et 490 nm). Après filtration la lumière est envoyée sur un miroir dichroïque qui réfléchit vers l'objectif toutes les longueurs d'onde inférieures ou égales à 500 nm. La sonde est excitée pendant 50 ms toutes les deux secondes. Le signal de

fluorescence émis est filtré (le filtre de mesure ne laisse passer que les longueurs d'ondes entre 523 et 547 nm), récupéré et amplifié par un photomultiplicateur. Le signal est alors numérisé par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instrument, USA) et analysé avec Clampex 8.2 (Axon instrument, USA). Les données sont analysées avec Clampfit 8.2 (Axon Instrument, USA) et Origin 7.0 (Microcal Software).

Pour chaque cellule étudiée, la calibration est réalisée en fin d'expérience en perfusant autour de la cellule du PSS (*cf.* tableau 7) avec 0,01 mM de nigéricine (qui perméabilise les membranes) et à différents pH (6,9-7,6).

B. Mesure du pH périmembranaire

La DHPE couplée à la fluorescéine est une sonde lipidique fluorescente sensible au pH et qui peut s'intégrer facilement parmi les phospholipides du feuillet externe de la membrane plasmique. Cette sonde est constituée d'une phosphatidyl éthanolamine avec deux groupements acide palmitique sur le squelette glycérol, et un couplage de la fluorescéine sur l'éthanolamine. Elle peut donc être utilisée pour mesurer le pH au niveau de la surface membranaire, et l'intensité de fluorescence est sensible aux changements de pH, pricipalement dans une gamme allant de pH 7 à 9.

Le dispositif expérimental utilisé pour les mesures de pHm est le même que celui utilisé pour le pHi. Les conditions d'incubation des cellules avec la sonde sont différentes : les cellules sont incubées dans du DMEM sans SVF contenant 1 µg/mL de DHPE-fluorescéine, pendant une heure à 37°C. Le milieu est ensuite éliminé et les cellules rincées deux fois avec du PSS. Les mesures s'effectuent dans du PSS (*cf.* tableau 7), à température ambiante. Une tête de perfusion, au dessus de la cellule, permet d'appliquer différentes solutions de PSS à pH 7, 7,2, 7,4 et 7,6 ce qui permet la calibration de la fluorescence émise par la sonde. La périfusion est ensuite coupée et le pHm de la cellule est déterminé lorsqu'il atteint une valeur stable. A la fin de chaque enregistrement un champ sans cellule est choisi afin de déterminer la part de signal liée à la fluorescence de fond. Dans le cas de la DHPE-fluorescéine, deux longueurs d'ondes d'excitation sont utilisées : 485 nm et 440 nm (indépendante du pH) et l'émission est mesurée à 535 nm. Le filtre dichroïque et le filtre de mesure utilisés sont donc les mêmes que pour le BCECF.

Les rapports de fluorescence R = F485 / F440 sont alors utilisés pour calculer le pHm.

VI. Isolement des cavéoles

A. Principe

Les cavéoles peuvent être extraites à partir d'homogénats cellulaires en fonction de leur insolubilité en présence de détergents particuliers ou de leur haute flottabilité après centrifugation sur gradient de densité. Nous avons choisi d'utiliser une technique d'isolement des cavéoles sans détergent, comme décrite par Ostrom et Liu et adaptée d'après Calaghan *et al* (Calaghan *et al.*, 2008; Ostrom and Liu, 2007). Cette technique consiste à lyser les cellules dans un tampon carbonate de sodium qui permet d'extraire les protéines solubles du cytoplasme ainsi que les membranes et les protéines qui y sont intégrées. Les membranes sont ensuite détruites, par sonication, en morceaux de membranes beaucoup plus petits, qui idéalement sont de la taille des radeaux lipidiques (ou "lipid rafts") et cavéoles. Les protéines sont ensuite séparées par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Au cours de l'ultracentrifugation, les morceaux de membranes riches en cholestérol (radeaux lipidiques et cavéoles), qui ont une densité plus faible que les autres zones membranaires, vont flotter dans la partie supérieure du gradient. Les autres morceaux, qui contiennent moins de cholestérol, restent dans le fond du tube, avec les protéines solubles.

B. Méthode

1. Préparation des lysats cellulaires

Cette technique nécessite environ 10 à 15 mg de protéines totales ce qui correspond à environ cinq flacons de cellules de 175 cm^2 à 90% de confluence. Chaque étape est à réaliser, tant que possible, sur la glace. Après aspiration des milieux de culture, les flacons sont rincés deux fois avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (afin de limiter l'activité des protéases). On dépose 2 mL de tampon de lyse (Na_2CO_3 500 mM, EDTA 0,5 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, réf P8340) 2% v/v) dans le premier flacon. Les cellules sont alors grattées avec un râteau et les 2 mL de lysat transférés dans le second flacon et ainsi de suite jusqu'au cinquième flacon.

Afin de bien lyser et fluidifier l'échantillon, le lysat cellulaire est ensuite passé plusieurs fois, à l'aide d'une seringue, au travers d'une aiguille 23G, ce qui permet de casser les filaments d'ADN. L'échantillon est alors soniqué (Vibra Cell; Sonics, Suisse) 3 fois 20 s à puissance maximum. La concentration en protéines est ensuite mesurée de manière à s'assurer que l'on ait bien au moins 10 mg de protéines totales.

2. Ultracentrifugation sur gradient de saccharose

Le gradient de saccharose discontinu nécessite la préparation de tampons contenant différentes concentrations de saccharose : 90%, 35% et 5%, comme décrits dans le **tableau 17**.

Tableau 17: Composition des solutions de saccharose

composant	90 % saccharose	35 % saccharose	5 % saccharose
Volume (mL) de MBS* (solution stock 10x)	5	5	5
Volume (mL) d'eau à ajouter avant d'ajuster le pH	15	20	30
Volume (mL) Na_2CO_3 (solution stock 1,5M)	0	8,3	8,3
Quantité de saccharose (g) pour 50 mL	45	17,5	2,5

*** MBS (MES-buffered saline) : MES (ou 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM.**

Pour réaliser le gradient, 2 mL de lysat sont d'abord déposés (≈10 mg de protéines) dans le fond d'un tube à ultracentrifugation de 13,2 mL (Beckman, réf 344059) adapté à un rotor de type Beckman SW 41 Ti. On ajoute ensuite 2 mL de solution à 90 % de saccharose, puis on mélange doucement à l'aide d'un vortex. On obtient donc une première solution à 45% de saccharose qui contient l'échantillon. Puis 4 mL de solution à 35% de saccharose sont déposés délicatement sur l'homogénat, de façon à ce que les 2 solutions ne se mélangent pas. Enfin, la solution à 5% de saccharose est déposée doucement sur la solution à 35% ; la démarcation entre les deux solutions doit être visible. Les tubes sont ensuite pesés, équilibrés deux à deux et mis à centrifuger à 4°C, pendant 17 h, à 39000 rpm (Rotor SW-41 et centrifugeuse Optima L-80 XP, Beckman Coulter, France). L'accélération doit être lente et la décélération sans

frein, de manière à ne pas perturber le gradient. Lorsque l'on ressort le tube de la centrifugeuse, on distingue un nuage blanc, à la jonction 35%-5%, qui correspond aux radeaux lipidiques (**Figure 34**).

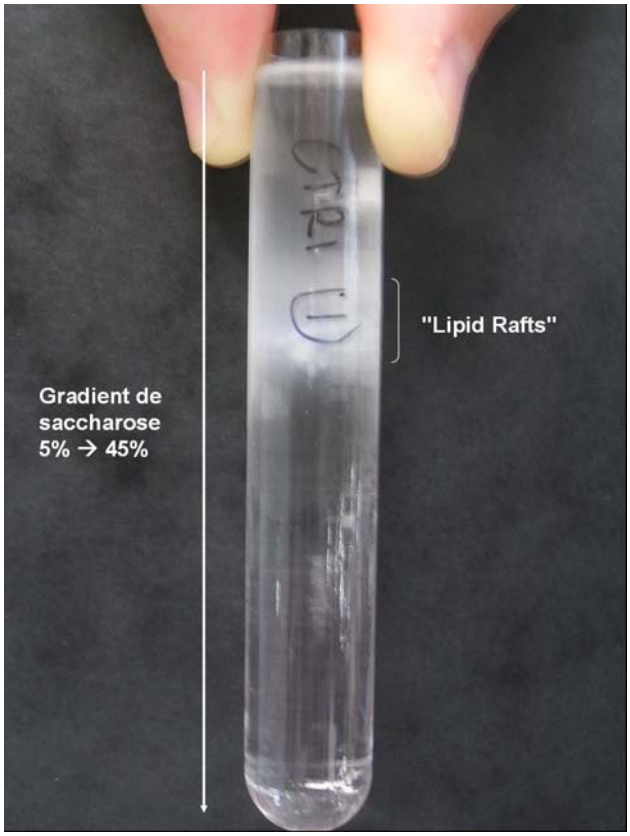


Figure 34: Isolement des radeaux lipidiques ("lipid rafts") sur gradient de saccharose.

Le contenu de chaque tube est collecté à l'aide d'une seringue et d'une grande aiguille, par fractions de 1 mL, prélevées à partir du fond du tube. Chaque fraction est numérotée de 1 à 12, la fraction 12 correspondant à la première fraction collectée au fond du tube. Les radeaux lipidiques sont retrouvés la plupart du temps dans les fractions 4-5 ou 5-6. Un dosage des protéines est réalisé sur chaque fraction et l'utilisation, en western blot, d'anticorps dirigés contre la cavéoline-1 (radeaux lipidiques) et la β-adaptine (membranes non radeaux lipidiques) permet d'identifier chaque fraction.

VII. Analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires

A. Principe

Cette technique repose sur l'extraction des lipides par un mélange de méthanol/chloroforme. L'addition d'une solution aqueuse permet la séparation de phases. La phase supérieure contient les composés hydrophiles tandis que les lipides sont dissouts dans la phase organique inférieure constituée de méthanol et de chloroforme. La séparation des classes de lipides est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). La chromatographie d'adsorption est une technique de séparation de composés basée sur la différence d'affinité existant entre les lipides, la phase mobile (solvants) qui entraîne par capillarité les lipides, et la phase stationnaire (silice) fixée sur plaque de verre. Après récupération de la silice, les phospholipides et triglycérides sont transestérifiés avec du méthanol en présence de trifluorure de bore en ester-méthyliques d'acides gras. Enfin, ces esters méthyliques d'acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

B. Méthode

L'extraction des lipides totaux des cellules est réalisée selon une méthode dérivée de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Cette extraction a été réalisée à partir des fractions récupérées après ultracentrifugation sur gradient de saccharose des lysats de cellules traitées ou non avec du DHA 1µM (environ 10 mg de protéines totales réparties sur 12 fractions de 1mL). 600 µL de chaque fraction sont alors utilisés pour l'extraction lipidique. Les phospholipides sont séparés des autres composés lipidiques par purification par chromatographie sur couche mince (CCM) avec une phase mobile constituée de 70 mL d'hexane, 30 mL de d'éther diéthylique et 1 mL d'acide acétique. Les acides gras sont ensuite transestérifiés en esters méthyliques d'acides gras avec du méthanol en présence de 14% de trifluorure de bore. Après fermeture sous azote, la réaction se produit en 1h30 à 100°C. Afin de récupérer les esters méthyliques d'acides gras, deux extractions successives à l'hexane utilisant la partition de phase avec de l'eau ultra-pure sont réalisées sur le mélange. Après

évaporation de l'hexane et pesée des esters méthyliques d'acides gras purifiés, un volume d'hexane adapté, c'est à dire qui permet d'obtenir une surface optimale pour une analyse par chromatographie en phase, est ajouté.

Le chromatographe utilisé est un modèle Trace GC, équipé d'un injecteur « cold on-column », muni d'un passeur automatique AS800 (Thermo Finnigan, France) et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le protocole de séparation en chromatographie en phase gazeuse a été élaboré de manière à séparer correctement les différents acides gras de l'échantillon. Pour cela, une colonne capillaire de 120 m et de diamètre interne de 0,25 mm a été utilisée. Elle possède une phase stationnaire polaire (BPX 70) qui correspond à une phase greffée en cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (70%) de 0,25 µm d'épaisseur. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 7 mL/min. La température du détecteur a été réglée à 280°C, celle de l'injecteur à 60°C. Pour chaque échantillon, le dosage a été réalisé sur l'injection d'un volume de 1 µL. Le programme de température du four a été établi de manière à obtenir une bonne séparation des différents pics d'acides gras : après quatre minutes à 60°C, une montée en température de 5°C/min de 165 à 185°C suivie d'un palier de 35 minutes et enfin une montée de 20°C/min de 185 à 215°C suivie d'un palier de 2 minutes. L'identification des esters méthyliques d'acides gras a été réalisée par comparaison de leur temps de rétention à ceux d'acides gras d'un mélange commercial (Supelco 37 component FAME mix, Sigma-Aldrich, France). La quantification des acides gras, basée sur la surface sous les pics du chromatogramme, a été calculée par le logiciel ChromQuest (**Figure 35**). Nous avons alors pu déterminer quel pourcentage des acides gras totaux représentait le DHA, au sein des différentes fractions, dans les conditions contrôle et de traitement.

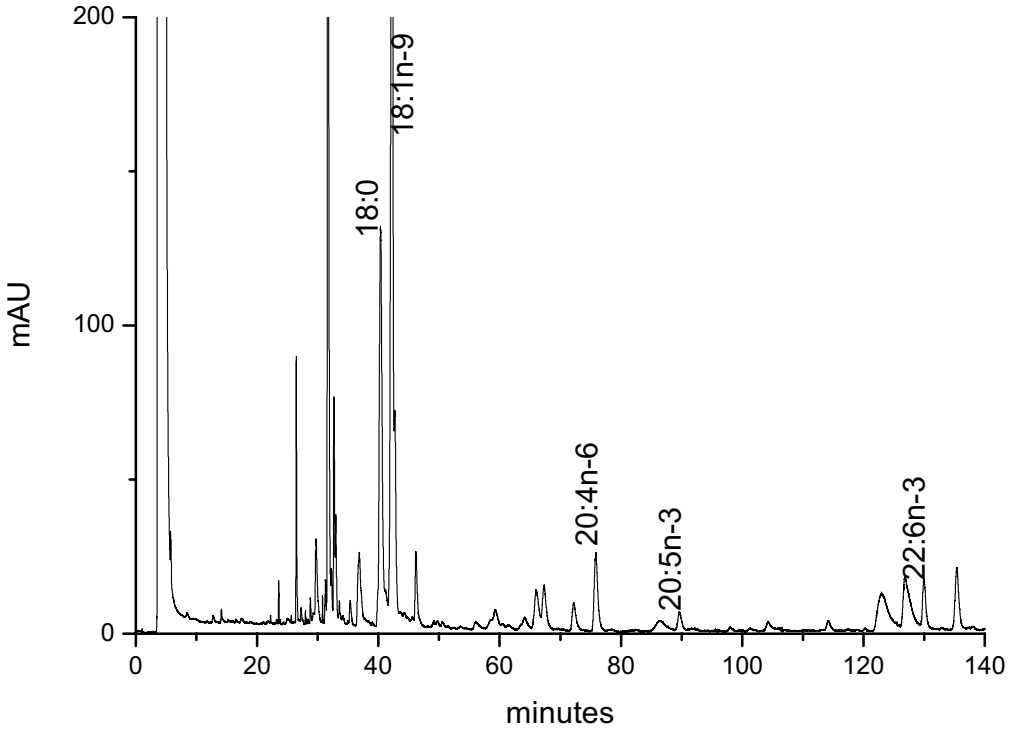


Figure 35 : Exemple de chromatogramme de la composition en acides gras des phospholipides membranaires de cellules MDA-MB-231.

VIII. Analyse des isoformes de PKC

L'activation de certaines isoformes de PKC peut conduire à leur translocation du cytosol vers la membrane plasmique. Afin d'observer si le traitement au DHA des cellules MDA-MB-231 pouvait modifier la répartition, et donc l'activation, des différentes isoformes de PKC nous avons utilisé une adaptation de la technique décrite par Judé et al. sur des cardiomyocytes de chien (Jude *et al.*, 2007). Cette technique consiste à récupérer dans un premier temps la fraction des protéines cytosoliques, par ultracentrifugation des échantillons, après lyse des cellules dans un tampon contenant du saccharose mais pas de détergent. L'utilisation par la suite d'un détergent permet alors de récolter la fraction de protéines membranaires ainsi que les protéines cytosoliques qui leur sont associées.

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans des flacons de 175 cm^2 jusqu'à quasi-confluence. Après rinçage du milieu de culture avec du PBS les cellules ont été grattées et récupérées, en présence d'un tampon d'extraction des protéines (**Tableau 18**), puis ont subi trois cycles de congélation dans l'azote liquide / décongélation au bain-marie, ce qui permet d'éclater les membranes cellulaires.

Tableau 18 : Composition du tampon d'extraction des protéines

Composés	**Concentration en mM**
Tris-HCl	20
Saccharose	250
EDTA	2
EGTA	2
2-mercaptoethanol	10
Dithiotréitol (DTT)	10
Polyméthylsulfonylfluoride (PMSF)*	1
Leupeptine*	0,02

*** Un cocktail d'inhibiteurs de protéases a également pu être utilisé à la place de ces deux composés.**

Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 100 000 x g pendant 75 minutes à 4°C.
Le surnageant qui est considéré comme étant la fraction soluble (assimilée aux protéines cytosoliques) a été collecté et congelé à –80°C.
Le culot a été homogénéisé de nouveau dans le même tampon d'extraction que celui utilisé précédemment, mais contenant en plus 0,5% de Triton X-100. Les homogénats ont été agités pendant 30 minutes à +4 °C, puis centrifugés à 15000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant considéré comme étant la fraction particulaire (assimilée aux protéines membranaires + protéines associées) des cellules a été récupéré et immédiatement congelé à –80°C. Lors de l'analyse en western blot, les anticorps dirigés contre la β-actine, la GAPDH, la β-adaptine ou la cavéoline-1 ont servi d'une part à normaliser les quantités de protéines déposées et d'autre part à s'assurer que la séparation des différentes fractions a été correctement effectuée.

Troisième partie

Résultats et discussion

I. Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité et la croissance de colonies de cellules cancéreuses : régulation des cathepsines à cystéine

A. Introduction

L'expression et l'activité de canaux sodiques dépendants du voltage sont associées au caractère invasif de différents cancers. Plusieurs études ont permis en effet de mettre en évidence ces canaux dans diverses lignées cellulaires et biopsies de cancer du sein, de la prostate, du poumon, de l'utérus, *etc*… (*cf.* revue bibliographique : canaux sodiques voltage-dépendants et cancer). Les mécanismes cellulaires qui pourraient être régulés par le Na_V sont encore mal connus, bien que plusieurs hypothèses aient été avancées, comme la modification de la morphologie cellulaire (Fraser *et al.*, 1999), de la migration (Fraser *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1998), de la galvanotaxie(Mycielska and Djamgoz, 2004), du transport du citrate, de l'endocytose et de l'exocytose et plus récemment de l'adhésion cellulaire (Chioni *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2010). En 2003, notre équipe proposait que les canaux $Na_V1.5$ sont responsables d'une entrée continue de sodium dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, due à l'existence d'un courant dit de « fenêtre », qui s'explique par le fait que le potentiel de membrane des cellules se situe dans une zone de voltage pour laquelle une partie des canaux Na_V de la cellule est activée et où tous ces canaux ne s'inactivent pas. Ainsi l'hypothèse émise était que la modification de l'homéostasie sodique pouvait être impliquée dans l'invasivité des cellules MDA-MB-231 via la régulation d'enzymes protéolytiques connues pour dégrader la matrice extracellulaire, comme les MMP (Roger *et al.*, 2003). Une étude a alors été menée sur l'implication des principales MMP responsables de la dégradation du collagène IV (gélatinases MMP-2 et MMP-9), élément constitutif des lames basales, et décrites comme étant impliquées dans la progression de différents cancers d'origine épithéliale, tels que les cancer du sein (Duffy *et al.*, 2000) ou du poumon (Hrabec *et al.*, 2002). Les résultats de cette étude ont montré que lorsqu'elles étaient exprimées et sécrétées, ces protéases n'étaient pas

ou peu actives, et nous ont alors conduits à penser que la dégradation de la matrice extracellulaire devait impliquer d'autres protéases (thèse de S. Roger, 2005). Alors que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de MMP pour des essais cliniques a été plutôt un échec, un intérêt grandissant s'est développé autour des cathepsines à cystéine (Mohamed and Sloane, 2006). Nous avons donc cherché à savoir si d'une part les cathepsines à cystéine jouaient un rôle important dans l'invasivité des cellules cancéreuses qui expriment le Na_V, et plus précisément dans leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire, et si d'autre part leur régulation pouvait être dépendante de l'activité du Na_V, et dans ce cas, par quels mécanismes. Les résultats de cette étude ont été publiés en 2009 dans l'article suivant.

B. Article

Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells

Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY.

J Biol Chem. 2009 Mar 27;284(13):8680-91. Epub 2009 Jan 28.

C. Résumé

Nous avons montré dans cette étude que les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 expriment des canaux sodiques voltage-dépendants, qui correspondent à l'association d'une sous-unité principale α, l'isoforme $Na_V1.5$, et de sous unités β régulatrices. Ces canaux sont responsables d'un courant sodique entrant soutenu, au potentiel de membrane des cellules. Bien que ces canaux ne régulent ni la multiplication ni la migration cellulaires, leur inhibition par un bloqueur spécifique, la tétrodotoxine (TTX), affecte à la fois l'activité gélatinolytique (mesurée par l'utilisation de DQ-gélatine) ainsi que l'invasivité cellulaire, entraînant une diminution du développement des colonies de cellules cancéreuses ainsi que de leur dissémination dans une matrice 3D de Matrigel™. Les cellules MDA-MB-231 expriment des cathepsines à cystéine qui jouent un rôle important dans l'invasivité (≈ 65%). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des cathepsines B et S entraîne une diminution significative de l'invasion sur inserts de Matrigel™ et l'addition de TTX n'entraîne pas de réduction supplémentaire de l'invasion. Ceci suggère que les cathepsines B et S sont impliquées dans l'invasivité et que leur activité protéolytique dépend en partie de l'activité du Na_V. Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules cancéreuses pulmonaires qui expriment le Na_V. L'inhibition du Na_V n'a pas d'effet sur la transcription, la traduction ni la sécrétion des cathepsines. Cependant, l'activité du Na_V entraîne une alcalinisation intracellulaire et une acidification périmembranaire favorable à l'activité de ces protéases acides. Ainsi nous proposons ce mécanisme général par lequel le Na_V augmente l'invasivité des cellules cancéreuses en favorisant l'activité pH-dépendante de cathepsines à cystéine.

D. Discussion

Toutes les études menées sur l'expression et la fonction des canaux Na_V dans le cancer du sein, du poumon ou de la prostate semblent être en accord sur le rôle joué par ces canaux dans l'invasivité des cellules cancéreuses. Cependant aucune d'entre elles n'a jusqu'à ce jour présenté de lien, d'un point de vue mécanistique, entre l'activité des canaux et la régulation de l'invasion cellulaire. Nous suggérons à travers notre étude que la présence de canaux Na_V fonctionnels soit responsable d'un courant sodique de "fenêtre" au potentiel de membrane des cellules et donc d'une une entrée continue de sodium dans les cellules cancéreuses. L'utilisation de vératridine, qui entraîne l'apparition d'un courant soutenu sans affecter l'inactivation rapide du Na_V et de ce fait simule une augmentation du courant de fenêtre,

permet de confirmer cette hypothèse puisqu'elle entraîne une augmentation de l'invasivité des cellules, sans modifier leur capacité de migration.

Le groupe de Mustafa Djamgoz à Londres propose cependant des mécanismes différents : les canaux Na_V interviendraient dans la régulation de l'adhésion et de la migration des cellules MDA-MB-231, par l'intermédiaire des sous-unités β et par la régulation de voies de signalisation impliquant la PKA (Chioni *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2010). Fraser et collaborateurs ont montré en 2005 que l'inhibition du canal par la TTX permettait de réduire la motilité cellulaire d'environ 50% (mesure du passage des cellules à travers des inserts de migration) (Fraser *et al.*, 2005), alors que nous ne retrouvions pas cet effet dans nos conditions expérimentales (Gillet *et al.*, 2009; Roger *et al.*, 2003). Nous avons alors cherché à comprendre quels facteurs pouvaient influencer à ce point l'effet de la TTX sur la migration cellulaire. Les conditions dans lesquelles nous nous placions étaient les suivantes : migration des cellules sur 24 h, inserts avec des pores de 8 µm de diamètre, utilisation d'un gradient de 5 à 10 % de SVF dans les milieux de culture entre les faces supérieure et inférieure de l'insert. En reprenant les conditions décrites par le groupe londonien (migration sur 10 h, pores de 12 µm de diamètre, gradient de SVF 1%-10%), nous n'avons pas non plus observé un quelconque effet de la TTX sur la migration. Ainsi, nous ne pensons pas que ce soient les conditions dans lesquelles sont réalisées les expériences qui jouent directement mais plutôt les conditions dans lesquelles les cellules sont cultivées. La concentration de SVF dans le milieu de culture en est un exemple. Dans une étude réalisée sur les cellules cancéreuses prostatiques de rat MAT-Ly-Lu, les mêmes auteurs ont montré une régulation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques $Na_V1.7$ par la concentration de SVF apportée dans le milieu de culture (Ding and Djamgoz, 2004). Lorsque les cellules (classiquement cultivées dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1% de SVF) sont privées de SVF pendant 24 h, puis replacées dans un milieu de culture normal, la densité de courant est augmentée. Si elles sont replacées dans un milieu plus riche en SVF (5%), on observe une diminution de cette densité de courant. D'autre part, l'utilisation des milieux sans SVF entraîne un ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation des courants, tandis que l'augmentation de SVF est responsable d'un déplacement de la relation d'inactivation en fonction du voltage vers des potentiels plus dépolarisés, sans affecter la conductance. La sensibilité des courants à la TTX est en outre augmentée de près de 20% et ce changement pourrait alors s'expliquer par l'expression d'autres isoformes que $Na_V1.7$. Les auteurs en concluent alors que les facteurs de croissance et hormones contenus dans le SVF peuvent être responsables de modifications

transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles sur les canaux sodiques dépendants du voltage. Les propriétés électrophysiologiques des canaux semblent aussi être affectées. Nous avons donc été amenés à nous intéresser à l'effet des variations de SVF dans le milieu de culture sur les courants sodiques des cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été cultivées 24 h avec 0, 5 ou 10 % de SVF dans leur milieu de culture avant l'étude en patch clamp des différentes propriétés des courants sodiques (**Figures 36 et 37**).

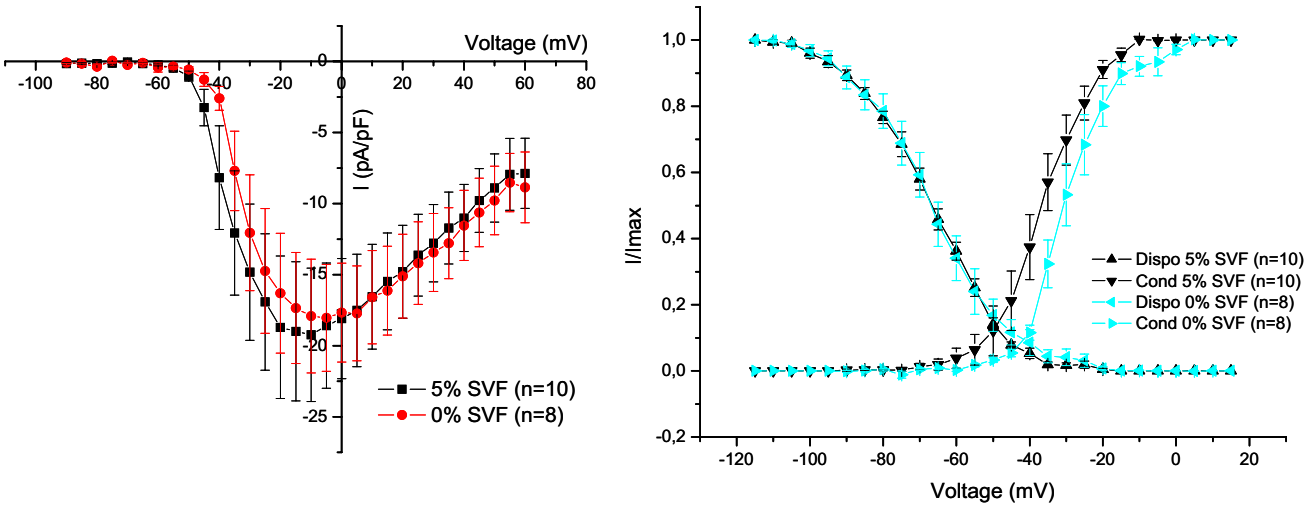


Figure 36 : Effet de la déplétion en SVF du milieu de culture sur le courant sodique. **A gauche, relations courant-voltage. A droite, relations conductance-voltage et disponibilité-voltage relatives. Dispo : disponibilité ; Cond : conductance ; n : nombre de cellules étudiées.**

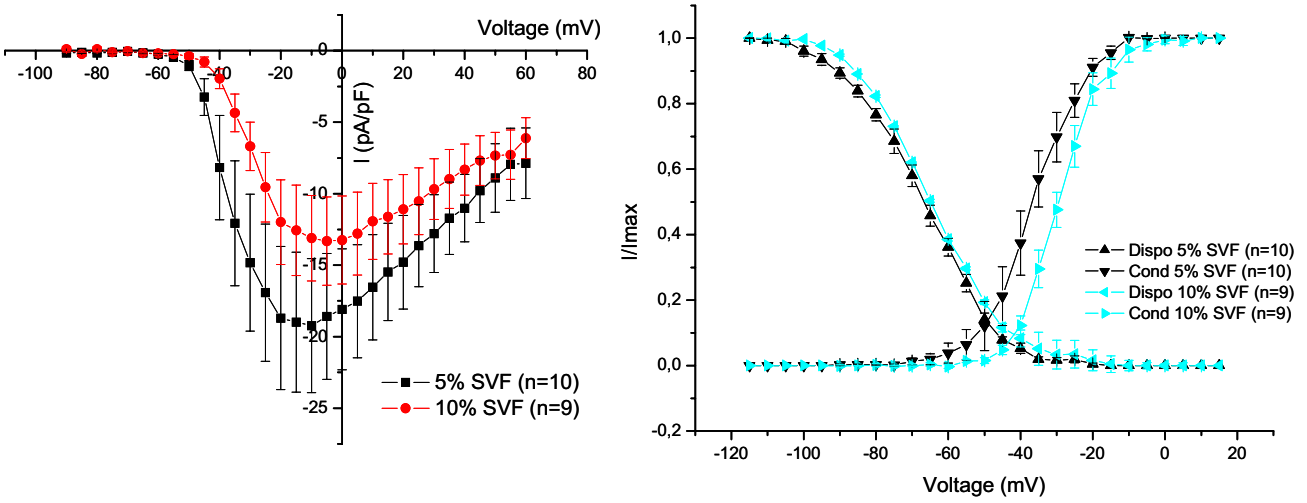


Figure 37 : Effet de l'augmentation de la concentration de SVF dans le milieu de culture sur le courant sodique. **A gauche, relations courant-voltage. A droite, relations conductance-voltage et disponibilité-voltage relatives. Dispo : disponibilité ; Cond : conductance ; n : nombre de cellules étudiées.**

Ainsi la suppression du SVF dans le milieu de culture ne semble pas modifier la densité de courant dans les cellules MDA-MB-231 (**Figure 36, gauche**). En revanche elle entraîne un décalage de la relation conductance-voltage vers des potentiels plus dépolarisés ($p<0,05$) par rapport aux conditions témoins (**Figure 36, droite**), sans modifier la disponiblité. La culture des cellules pendant 24 h en présence de 10% de SVF n'entraîne pas non plus de modification significative de la densité de courant, même si une tendance à la diminution est observée (**Figure 37, gauche**), ni de la disponibilité. Dans ces conditions, la relation conductance-voltage est en revanche également décalée vers des potentiels dépolarisés ($p<0,01$) (**Figure 37, droite**).

La concentration des différents constituants (protéiques ou lipidiques) du sérum semble donc jouer un rôle important dans la régulation des propriétés électrophysiologiques des canaux sodiques. On peut donc facilement imaginer que l'utilisation dans les milieux de culture de lots de sérum de composition différente puisse entraîner des variations importantes dans les résultats obtenus pour un même type d'expérience. Ces variations pourraient être dues par exemple à des modifications d'expression de protéines impliquées dans la régulation du Na_V comme les protéines kinases PKA ou PKC, ou les sous-unités β régulatrices, ces différentes protéines ayant été par ailleurs impliquées dans la régulation de la migration des cellules MDA-MB-231 (Chioni *et al.*, 2009; Chioni *et al.*, 2010). Une autre hypothèse servant à expliquer les différences d'effets de la TTX pourrait être que certains facteurs du milieu de culture influencent l'expression fonctionnelle d'une isoforme de Na_V par rapport à une autre. En effet, il a été montré sur les cellules cancéreuses de sein et de prostate que des ARNm codant pour de nombreuses isoformes de canaux Na_V étaient exprimées (Diss *et al.*, 1998; Diss *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2005; Jude *et al.*, 2006). Enfin, si l'effet combiné de la TTX et de divers facteurs contenus dans le SVF peut se traduire par une modification de l'expression du Na_V ou de ses protéines régulatrices, des modifications au niveau de l'adressage des sous-unités α et/ou des sous-unités β du Na_V sont aussi envisageables. Une autre réponse à cet effet pourrait ainsi être une augmentation au niveau membranaire des sous-unités β, qui peuvent être adressées à la membrane de façon indépendante de la sous-unité α (Zimmer *et al.*, 2002), et qui pourraient alors, en tant que molécules d'adhésion, modifier la migration cellulaire. Certains canaux et échangeurs ioniques sont par ailleurs connus pour présenter une modification de leur activité en fonction de leur localisation ou non dans les microdomaines membranaires comme les radeaux lipidiques et les cavéoles (Abi-Char *et al.*, 2007; Tekpli *et al.*, 2008; Tillman and Cascio, 2003). Une modification de la distribution des canaux Na_V au

sein de la membrane pourrait alors avoir des conséquences sur leur fonction et donc sur les propriétés de migration et d'invasion des cellules MDA-MB-231.

L'hypothèse d'une éventuelle localisation des canaux Na_V dans les microdomaines membranaires des cellules MDA-MB-231 est d'autant plus intéressante que ces domaines sont connus pour leur rôle dans la compartimentation et la modulation de voies de signalisation cellulaires. En effet, si dans notre étude nous sommes parvenus a montrer que la régulation du pH intracellulaire et périmembranaire était dépendante de l'activité des canaux Na_V, nous n'avons pas encore déterminé par quels mécanismes cette régulation pouvait avoir lieu. Plusieurs modulateurs du pH pourraient être impliqués, comme les échangeurs sodium-proton (NHE), les cotransporteurs sodium-bicarbonate (NBC), l'ATPase à protons de type vacuolaire (V-ATPase) ou encore les co-transporteurs proton-lactate et les anhydrases carboniques (CA). Certains de ces modulateurs de pH (V-ATPase, NHE) ont été retrouvés dans les radeaux lipidiques des cellules comme les ostéoclastes (Ryu *et al.*, 2010) ainsi que dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Bourguignon *et al.*, 2004). Nous pensons que la co-localisation possible des canaux Na_V et de ces modulateurs du pH dans les radeaux lipidiques pourrait favoriser des interactions directes ou indirectes entre ces protéines ainsi que leur régulation très localisée. Si par ailleurs on s'intéresse aux résultats de mesure du pH périmembranaire avec la sonde fluorescente DHPE-fluoresceine, on remarque que le pH mesuré lorsque le Na_V est actif est d'environ 7,3. Cette valeur correspond au pH périmembranaire global et nous pensons que le pH pourrait être beaucoup plus acide dans certaines zones membranaires, où il y aurait une concentration de régulateurs comme le NHE, ce qui pourrait alors favoriser localement l'activité des cathepsines à cystéine. Cette hypothèse est déjà en partie validée par Bourguignon et collaborateurs qui suggèrent que l'activité du NHE1 localisé dans les radeaux lipidiques favorise l'acidification péricellulaire nécessaire à l'activation des cathepsines B ainsi qu'à la dégradation de la matrice extracellulaire (Bourguignon *et al.*, 2004). Nous avons alors cherché à savoir si le Na_V pouvait être localisé dans ces microdomaines membranaires. Des expériences de séparation des radeaux lipidiques par ultracentrifugation sur gradient de saccharose (*cf.* Matériel et méthodes) ont donc été réalisées. L'analyse en western blot des fractions obtenues nous à permis de constater que les canaux Na_V et le NHE1 étaient retrouvés dans les fractions riches en cavéoline-1, une protéine caractéristique d'un type particulier de radeaux lipidiques, les cavéoles (**Figure 38**). Des études en microscopie confocale sont actuellement en cours afin de pouvoir confirmer cette hypothèse de co-localisation des protéines $Na_V1.5$ et NHE1.

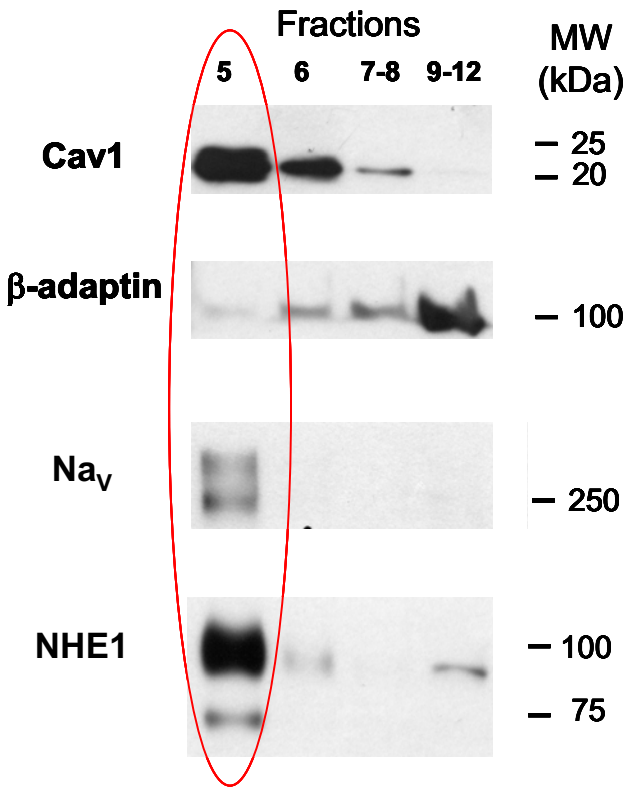


Figure 38 : Analyse en western blot de la localisation du Na_V et du NHE1 dans les différentes fractions membranaires. **La cavéoline 1 (Cav1) est utilisée comme marqueur de radeaux lipidiques particuliers, les cavéoles et la β-adaptine comme marqueur des fractions membranaires autres que les radeaux lipidiques. Le Na_V a été détecté grâce à l'anticorps Pan-Na_V.**

Comme nous l'avons suggéré précédemment, nous pensons que cette localisation particulière dans les cavéoles pourrait favoriser les interactions entre les protéines qui y sont regroupées. L'étude du rôle du NHE1 dans la régulation du pH intracellulaire et de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires, ainsi que de sa régulation par le Na_V a été réalisée dans le cadre d'un stage d'une étudiante en Master 2 (Mémoire de L. Brisson, 2009). Au cours de ce stage, cette étudiante a pu montrer d'une part, par l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques spécifiques ainsi que des siRNA dirigés contre le NHE1, que cet échangeur était le principal responsable de l'efflux de protons après acidification intracellulaire des cellules MDA-MB-231. D'autre part, une diminution de cet efflux de protons était observée lorsque les cellules étaient traitées avec la TTX qui inhibe l'activité des canaux Na_V. Les tests d'invasion sur 24 h des cellules MDA-MB-231 ont par ailleurs montré que l'inhibition du NHE1 entraînait une réduction de 30 à 40 % de l'invasivité des cellules et que l'inhibition simultanée du Na_V (TTX ou siRNA dirigé contre $Na_V1.5$) n'entraînait pas de réduction supplémentaire de cette invasivité. Ainsi, même si des expériences complémentaires restent à réaliser, tous ces résultats suggèrent que les protéines NHE1 et $Na_V1.5$ utilisent une voie commune pour

réguler l'invasion des cellules MDA-MB-231, et qu'il existe une relation entre le fonctionnement de ces deux protéines. Il conviendra donc par la suite de déterminer la nature de cette relation : la régulation de l'activité du NHE est-elle une conséquence du courant de fenêtre ou existe-t-il une interaction directe entre les protéines $Na_V1.5$ et NHE1 ?

En conclusion, cette étude permet de proposer un mécanisme nouveau de régulation de l'invasivité des cellules cancéreuses très agressives. Les canaux Na_V peuvent ainsi être considérés comme de nouvelles cibles dans le traitement du développement des tumeurs et des métastases. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à la régulation de ce canal par les AGPI n-3, des acides gras qui appartiennent aux composants alimentaires dont les effets anti-cancéreux sont reconnus, mais dont les mécanismes d'action restent encore à définir.

II. Régulation des canaux sodiques voltage-dépendants et de l'invasivité cellulaire par l'acide docosahexaènoïque

A. Introduction

Les comportements alimentaires peuvent représenter un facteur important dans l'apparition de certains cancers (Doll, 1992). Des études épidémiologiques et expérimentales ont suggéré en particulier que les acides gras polyinsaturés de la série n-3 (AGPI n-3) apportés par l'alimentation pouvaient inhiber le développement et la progression du cancer du sein (Rose and Connolly, 1999). Les premières études permettant d'établir un lien entre les habitudes alimentaires et l'incidence du cancer du sein remontent aux années 1970 (Buell, 1973), puisque l'augmentation du risque de développer un cancer du sein chez les femmes japonaises émigrant aux Etats-Unis avait été attribuée principalement à leur changement de régime alimentaire et en particulier à la diminution de la consommation de poissons gras marins riches en AGPI n-3 (Wynder *et al.*, 1986). Les acides gras auxquels ces effets bénéfiques ont été principalement attribués sont l'acide eicosapentaènoïque (EPA, 20:5 n-3) et l'acide docosahexaènoïque (DHA, 22:6 n-3). Les différentes études épidémiologiques et expérimentations animales s'intéressant aux effets des AGPI n-3 sur l'incidence du cancer du sein et l'évolution du développement des tumeurs mammaires ont cependant apporté des résultats parfois discordants, souvent liés à des différences de méthodologies (Bougnoux, 1999). En revanche, la plupart des études réalisées *in vitro* semblent être en accord sur les effets bénéfiques des AGPI n-3. De nombreuses expériences montrent un effet cytotoxique ou anti-prolifératif sur les cellules cancéreuses mammaires, quelles que soient les conditions expérimentales (Begin and Ells, 1987; Chajes *et al.*, 1995; Colquhoun and Schumacher, 2001; Grammatikos *et al.*, 1994; Rose and Connolly, 1990) et une absence d'effet sur les cellules normales (Diggle, 2002). De plus, il a été montré que le DHA pouvait réduire l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*, ou injectées à des souris (Kinoshita *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1996). Il a par ailleurs été rapporté que la diminution de la synthèse d'AGPI n-6 au profit des AGPI n-3, du fait de la surexpression du gène codant pour

la n-3 désaturase de *C. elegans*, permettait de réduire l'invasivité de cellules cancéreuses pulmonaires (Xia *et al.*, 2005).

Les effets observés sur la prolifération cellulaire ont principalement été obtenus par l'utilisation de concentrations de DHA supérieures à 30 μM (Barascu *et al.*, 2006). Cependant nous pensons que l'utilisation de doses plus faibles, de l'ordre du micromolaire, pourrait également avoir un effet sur des protéines cibles qui ne sont pas impliquées dans la prolifération cellulaire mais plutôt dans les mécanismes d'invasivité des cellules cancéreuses. La comparaison des effets protecteurs des AGPI n-3 sur les maladies cardiovasculaires et le cancer du sein nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses en ce qui concerne les cibles moléculaires et les voies de signalisation communes pouvant être impliquées. Parmi celles-ci figurent les canaux ioniques (Gillet *et al.*, 2010; Jude *et al.*, 2006).

Le groupe d'Alexander Leaf (Boston, USA) s'est intéressé au début des années 1990 aux effets cardioprotecteurs des AGPI n-3 et proposait que ces effets puissent passer par une modulation de l'activité des canaux ioniques. Leurs premiers travaux menés sur des cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ont montré que l'application de courte durée de faibles concentrations d'EPA (IC_{50} = 4,8 μM), apporté sous forme d'acide gras libre, permettait de bloquer les canaux sodiques $Na_V1.5$ et d'augmenter leur inactivation (Xiao *et al.*, 1995). Des effets identiques étaient retrouvés avec le DHA mais pas avec les acides gras mono-insaturés (18:1n-9) ou saturés (18:0). L'application de DHA ou d'EPA sous forme estérifiée n'avait pas non plus d'effet. Les travaux de Leifert et collaborateurs confirmaient ces effets quelques années plus tard sur des cardiomyocytes de rats adultes (Leifert *et al.*, 1999). En transfectant des cellules HEK293t avec le $Na_V1.5$ humain, Xiao et collaborateurs ont également montré que les AGPI n-3 inhibaient de manière dose-dépendante les courants sodiques (Xiao *et al.*, 1998). Plusieurs hypothèses concernant les mécanismes d'action des AGPI n-3 sous forme libre ont alors été proposées. Ils pouvaient tout d'abord agir par interaction directe avec les canaux Na_V, leur effet étant principalement lié au nombre de doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée et ainsi qu'à la présence d'un groupement carboxyle libre (Kang and Leaf, 1996; Xiao *et al.*, 1995). Cet effet pouvait également passer par une modification de la fluidité membranaire (Leifert *et al.*, 1999). Il a cependant été montré par la suite que d'autres courants ioniques comme I_{TO}, I_{CaL}, I_{KACh} ou $I_{Cl,AMPc}$, pouvaient être bloqués par les mêmes concentrations d'AGPI n-3 (Leaf *et al.*, 2002). Les auteurs ont alors remis en cause l'hypothèse d'interaction directe des acides gras avec les canaux ioniques et se sont tournés vers la théorie proposée par le groupe d'Andersen selon

laquelle l'incorporation des AGPI n-3 aux phospholipides membranaires pouvait modifier la tension exercée par la membrane sur les canaux ioniques, entraînant ainsi des changements de conformation des canaux et des modifications de leur propriétés électrophysiologiques (Andersen *et al.*, 1999). L'année suivante, Judé et collaborateurs ont émis l'hypothèse que les effets des AGPI n-3 pouvaient être dus à leur caractère hautement peroxydable du fait de leur nombre important de doubles liaisons et que les produits de la peroxydation lipidique pouvaient alors avoir un effet direct sur les canaux ioniques ou indirect par la modification de la fluidité membranaire (Jude *et al.*, 2003). Ils ont ainsi montré que la prévention de la lipoperoxydation du DHA par la vitamine E (α-tocophérol) inhibait ses effets de blocage du courant I_{TO}, alors que sa stimulation par H_2O_2 l'augmentait.

Tous ces résultats ont été obtenus par des applications courtes (quelques minutes) d'AGPI n-3 sur les cellules. Cependant nous pensons que les effets bénéfiques des AGPI n-3 dans les pathologies comme le cancer ou les maladies cardio-vasculaires passent par un effet chronique, lié à leur incorporation par les cellules suite à leur apport par l'alimentation. Aussi nous avons choisi d'observer les conséquences d'une supplémentation en DHA du milieu de culture des cellules MDA-MB-231, pendant cinq jours, sur les différentes propriétés cellulaires (prolifération, migration, invasion) ainsi que sur l'activité des canaux Na_V, le but de notre étude étant de déterminer si à des concentrations non toxiques et qui ne modifient pas la prolifération cellulaire, les AGPI n-3 sont capables d'inhiber des cibles impliquées dans l'invasivité cellulaire et en particulier les canaux sodiques voltage-dépendants. Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de différentes concentrations de DHA sur la prolifération des cellules, puis observé l'effet d'une concentration non-antiproliférative sur la migration et l'invasion des cellules. Enfin nous nous sommes intéressés aux effets du DHA sur les propriétés électrophysiologiques du Na_V, mais aussi sur son expression et sa localisation dans la membrane.

B. Résultats

Effet des acides gras sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses MDA-MB-231

Avant de tester l'effet du DHA sur les propriétés de migration et d'invasion des cellules, nous avons dû déterminer à partir de quelle concentration le DHA modifiait la prolifération cellulaire. Celle-ci a été évaluée par le test MTT après cinq jours de culture des cellules en présence de différentes concentrations de DHA ou d'acide oléique (OA), décrit préalablement comme n'affectant pas l'activité des canaux Na_V en application aiguë, même sous sa forme acide gras libre. Les acides gras ont par ailleurs été apportés sous forme d'esters méthyliques plutôt que sous forme d'acides gras libres ; il a en effet été observé précédemment au laboratoire que sous forme méthyl-ester, les acides gras sont moins sensibles à la peroxydation. Les résultats sont présentés dans la **figure 39**.

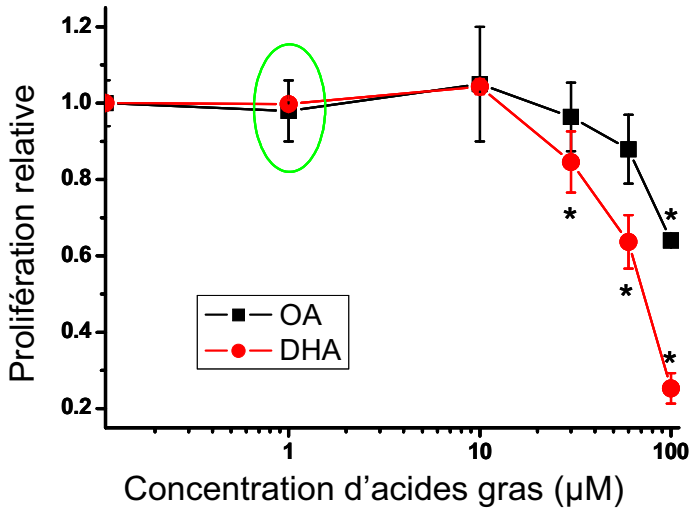
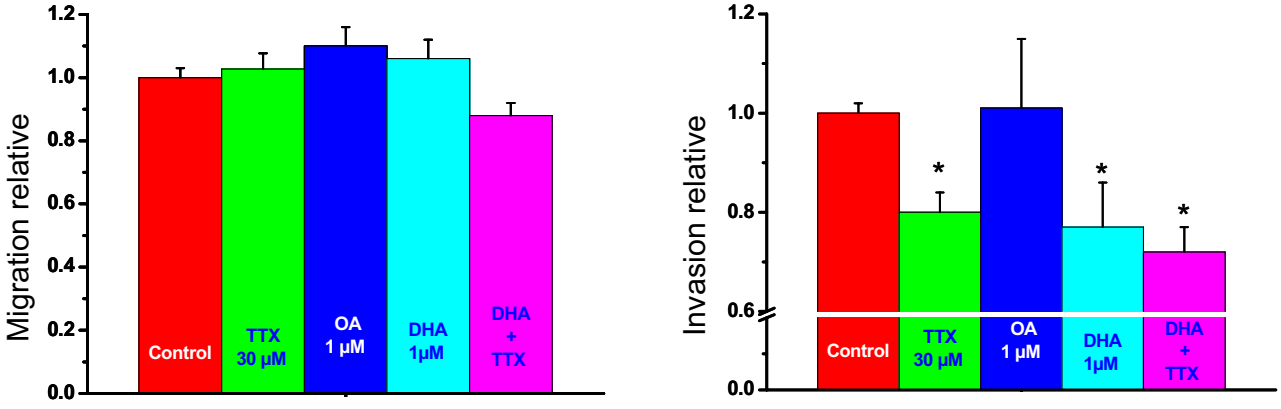


Figure 39 : Effet des acides gras insaturés sur la prolifération des cellules MDA-MB-231. **Les cellules ont été cultivées pendant 5 jours en présence de différentes concentrations (1 à 100 µM) d'acide oléique (OA) et d'acide docosahexaènoïque (DHA). Les valeurs de prolifération relative correspondent au rapport des absorbances mesurées dans les conditions OA et DHA sur les absorbances mesurées dans les conditions témoins. * différence significative (p<0,05) par rapport au témoin. Les points entourés d'un trait vert correspondent à la concentration d'acides gras qui a été retenue pour les expériences suivantes (migration, invasion, patch-clamp, etc…).**

Alors que l'on observe que l'OA n'a aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire pour des concentrations jusqu'à 50 µM, le DHA entraine déjà une diminution de la prolifération à

30 µM. La concentration de 10 µM de DHA semblant être une valeur seuil au-delà de laquelle un effet sur la prolifération pourrait être observé, nous avons préféré travailler par la suite avec des concentrations d'acides gras de l'ordre du micromolaire.

Nous nous sommes alors intéressés à l'effet d'une supplémentation du milieu de culture pendant 5 jours avec 1 µM de DHA ou 1 µM d'OA, sur la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231 (**Figure 40**). Nous observons que ni l'OA, ni le DHA ne modifie la migration des cellules. Le blocage du Na_V par la TTX n'entraîne pas non plus de modification



de la migration, que les cellules aient été préalablement traitées ou non avec du DHA. En revanche, la supplémentation en DHA entraîne une diminution de l'invasivité des cellules de plus de 20%, comparable à celle observée lorsque l'activité du Na_V est bloquée avec la TTX. L'application conjointe de TTX sur les cellules traitées au DHA n'entraîne pas de réduction supplémentaire de l'invasion. La supplémentation en OA n'a aucun effet sur l'invasion.

Figure 40 : Effet des acides gras insaturés et de la TTX sur la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231. **Les cellules ont été cultivées pendant 5 jours en présence de 1 µM d'acide oléique (OA) ou d'acide docosahexaènoïque (DHA). Leurs capacités de migration et d'invasion ont ensuite été testées sur 24 h. * différence significative (p<0,05) par rapport au témoin.**

L'absence d'effet additif de la TTX sur la réduction d'invasivité entraînée par la supplémentation des cellules en DHA 1 µM suggère que ces deux substances pourraient agir par une voie de régulation commune de l'invasion impliquant le Na_V. Nous nous sommes donc intéressés par la suite aux effets de cet acide gras sur l'activité des canaux sodiques des cellules MDA-MB-231.

Effet des acides gras sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231

Les AGPI n-3, lorsqu'ils sont appliqués en aigu sous forme d'esters méthyliques, ne semblent pas affecter les courants sodiques enregistrés dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés (Kang and Leaf, 1996). Nous avons donc dans un premier temps cherché à savoir s'il en était de même pour les courants I_{Na} des cellules MDA-MB-231. Les esters méthyliques de DHA et d'OA ont donc été solubilisés dans des solutions de PSS contenant 3 g/L de BSA, qui correspond à la concentration de BSA estimée dans le milieu de culture. L'application pendant 10 à 15 minutes d'une solution à 1 µM d'OA ou de DHA n'a aucun effet sur le courant sodique mesuré pour un créneau de dépolarisation de -100 à -5 mV (**Figure 41**). La TTX en revanche inhibe bien le courant sodique.

.

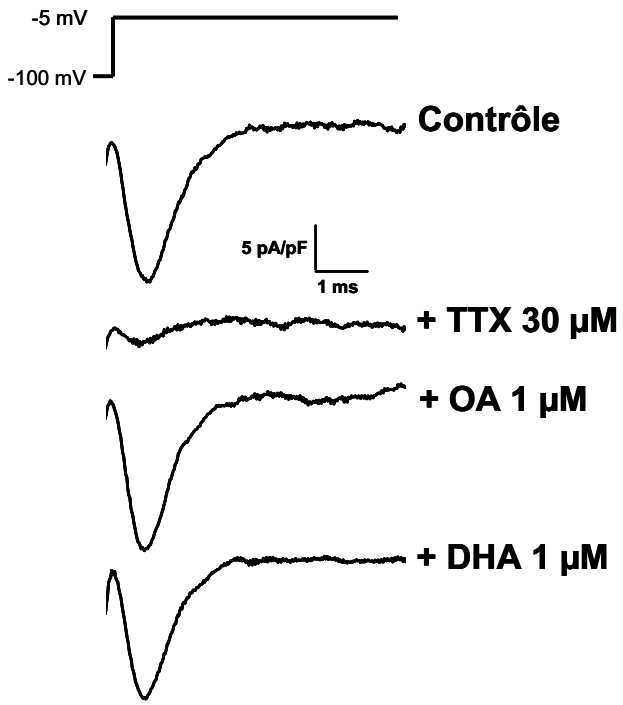


Figure 41 : Effet de l'application aiguë des solutions d'acides gras et de la TTX, sur les courants sodiques. **Exemples de courants enregistrés sur les cellules MDA-MB-231, lors de l'imposition de créneaux de voltage de -100 à -5 mV.**

Les courants sodiques ont également été analysés après que les cellules aient été cultivées pendant 5 jours en présence ou non d'OA 1 µM ou de DHA 1µM. Les résultats sont présentés

dans la **figure 42**. Alors que le traitement des cellules avec 1 µM d'OA n'entraîne pas de modification de la densité des courants sodiques enregistrés lors de l'imposition de créneaux de voltage de -100 à + 60 mV par incréments de 5 mV (**Figure 42A**), l'apport de DHA 1 µM sur plusieurs jours entraîne une réduction importante des ces courants. La **figure 42B** montre les modifications entrainées par les acides gras sur la relation courant-voltage. La **figure 42C** montre que le courant maximum enregistré pour une dépolarisation de -100 à -5 mV est diminué de manière significative par le DHA ($p<0,05$) par rapport au contrôle (5,3 ± 1,7 *vs.* 14,5 ± 4,5 pA/pF) alors que l'OA n'a pas d'effet (12,1 ± 3,1 pA/pF).

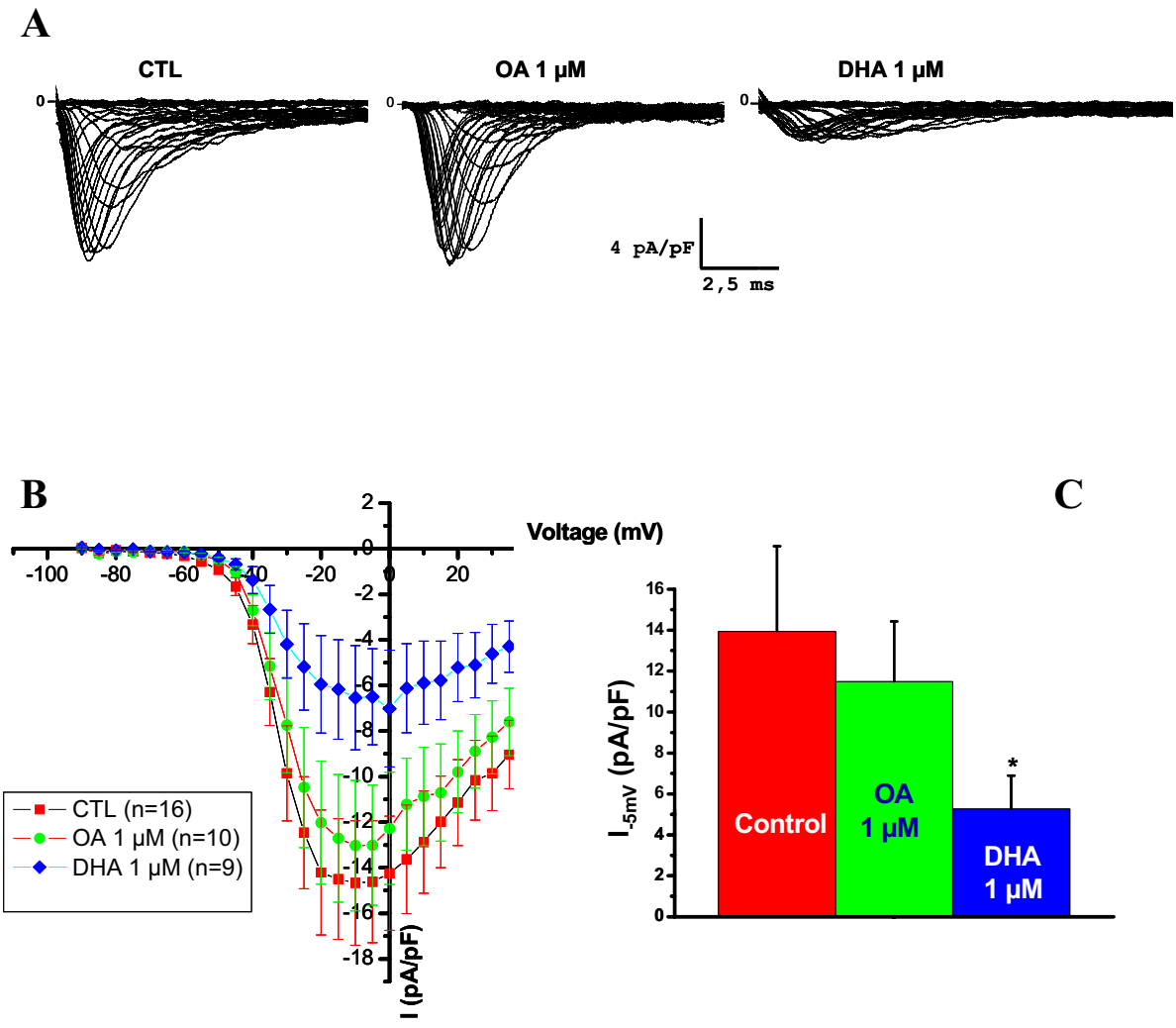


Figure 42 : Effet de 5 jours de supplémentation du milieu de culture en OA ou en DHA sur le courant sodique des cellules MDA-MB-231. **A, Exemples de tracés de courants sodiques obtenus en protocole courant-voltage. B, Effet des acides gras sur la relation courant-voltage du Na_V. C, Effet des acides gras sur le pic de courant sodique enregistré pour un créneau de dépolarisation de -100 mV à -5 mV. * différence significative ($p<0,05$). n :nombre de cellules étudiées.**

Les AGPI n-3 peuvent bloquer l'activité des canaux $Na_V1.5$ humains de manière dose-dépendante (Xiao *et al.*, 1998). Nous avons alors cherché à savoir si dans les cas où les acides gras sont apportés de manière chronique et sous forme d'esters méthyliques, une relation similaire peut être observée avec les canaux Na_V des cellules MDA-MB-231, sachant que dans l'étude de Xiao, les AGPI n-3 étaient appliqués en aigu et sous forme d'acides gras libres. Les résultats obtenus avec différentes concentrations de DHA et d'OA apportées aux cellules pendant 5 jours sont présentés dans la **figure 43**.

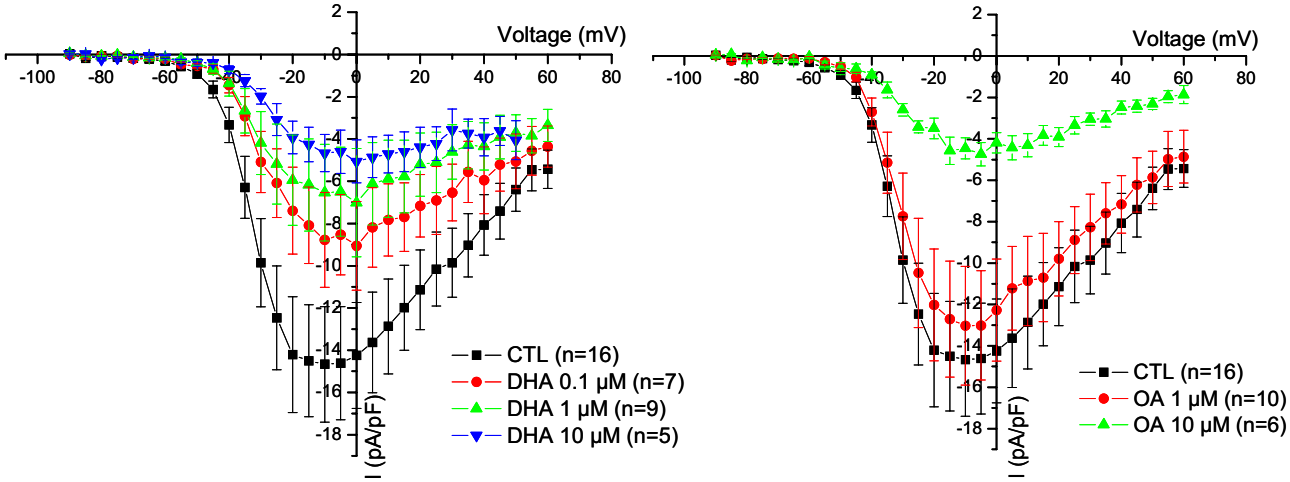
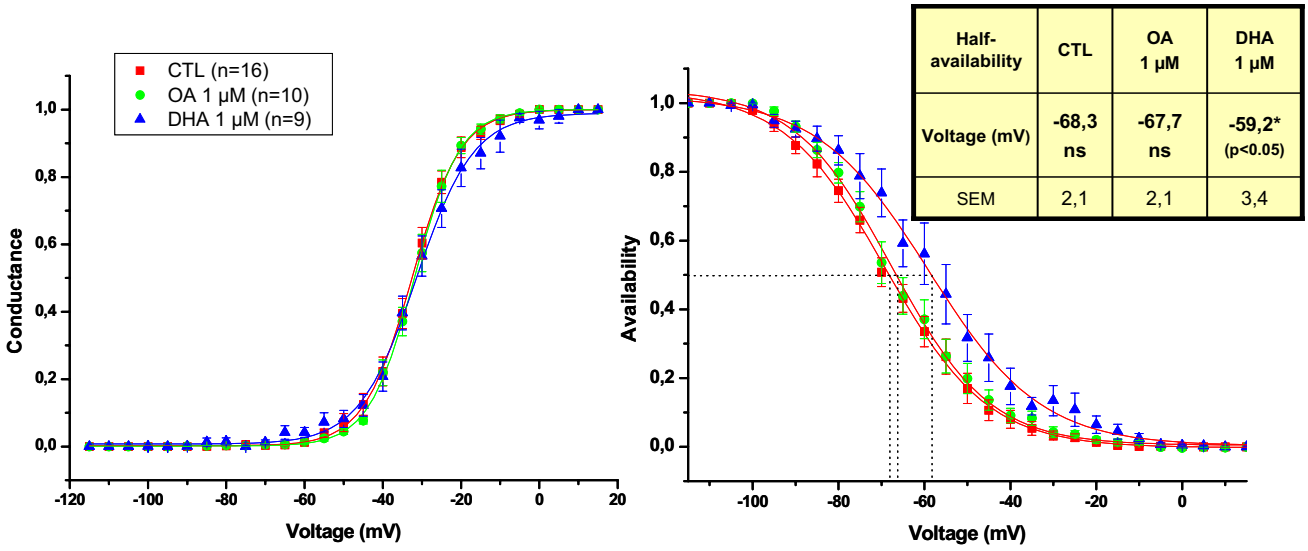


Figure 43 : Effet de différentes concentrations d'acides gras sur la relation courant-voltage. **Les cellules ont reçu ou non (CTL) une supplémentation en DHA (0,1 µM, 1 µM ou 10 µM) ou en OA (1 µM ou 10 µM) pendant 5 jours. n : nombre de cellules étudiées.**

L'étude de la relation courant-voltage montre que la densité de courant diminue lorsque la concentration de DHA augmente. Ainsi la densité de courant mesurée pour une dépolarisation à -5 mV est de 14,6 ± 2,7 pA/pF ; 8,5 ± 1,9 pA/pF ; 6,5 ± 2,1 pA/pF et 4,6 ± 1 pA/pF pour des concentrations de DHA respectives de 0 ; 0,1 µM ; 1 µM et 10 µM. Cela signifie que pour des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 µM de DHA on observe des réductions respectives de la densité de courant maximal d'environ 42 ± 13 % ; 56 ± 14 % et 68 ± 7 %. D'une manière surprenante, si le traitement des cellules par l'OA 1 µM ne modifie pas la densité de courant, l'utilisation d'OA 10 µM entraîne une diminution de celle-ci (67 ± 4 %), du même ordre de grandeur que le DHA 10 µM. Ce résultat suggère donc que pour des concentrations de l'ordre de la dizaine de micromolaires, l'effet d'inhibition du courant sodique par les acides gras n'est pas spécifique aux AGPI n-3, puisqu'il peut être également provoqué par des acides gras

mono-insaturés. Ces résultats nous confortent donc dans notre choix d'une concentration de 1 µM pour étudier les effets du DHA sur les différentes propriétés du Na_V.

Les études menées sur le Na_V cardiaque ont pour la plupart montré que les AGPI n-3 entraînaient un déplacement important de la relation inactivation-voltage vers des potentiels hyperpolarisés. Les courbes représentées sur la partie gauche de la **figure 44** montrent l'effet des acides gras sur l'activation dépendante du voltage des canaux sodiques et celles de la partie droite montrent l'effet des acides gras sur la disponibilité dépendante du voltage.



Half-availability	CTL	OA 1 µM	DHA 1 µM
Voltage (mV)	-68,3 ns	-67,7 ns	-59,2* (p<0.05)
SEM	2,1	2,1	3,4

Figure 44 : Effet de la supplémentation du milieu de culture avec 1 µM d'OA ou de DHA sur l'activation (à gauche) et la disponibilité (à droite) des canaux sodiques des cellules MDA-MB-231. **Dans le tableau en haut à droite sont indiquées les valeurs moyennes et l'erreur standard de la moyenne (SEM) des potentiels de membrane correspondants à la demi-disponiblité. * différence significative (p<0,05). n : nombre de cellules étudiées.**

Le traitement des cellules pendant 5 jours avec 1 µM d'OA ne semble pas modifier l'activation ni la disponibilité dépendantes du voltage des courants sodiques. Le DHA à 1 µM ne modifie pas non plus l'activation mais entraîne en revanche un déplacement de la disponibilité d'environ 9 mV vers des potentiels dépolarisés. Cet effet est beaucoup moins important que celui observé par l'équipe de Leaf sur les canaux sodiques cardiaques transfectés dans les cellules HEK293t, avec des concentrations en AGPI n-3 de 5 µM (Xiao *et al.*, 2000), et il est par ailleurs inversé puisque nous observons un déplacement de la relation disponibilité-voltage vers des potentiels dépolarisés. Nous avons donc par la suite vérifié si le potentiel de

membrane des cellules pouvait être modifié par l'apport d'OA ou de DHA. Si l'OA n'entraîne pas de changement de ce potentiel (-36,8 ± 6 *vs.* -34,3 ± 5 mV pour les cellules témoins), le DHA semble le déplacer vers des valeurs plus positives (-26,5 ± 3 *vs.* -34,3 ± 5 pour les cellules témoins) ; cependant cette différence n'est pas statistiquement significative.

La diminution de l'amplitude des courants sodiques par le DHA ainsi que la modification de la disponibilité dépendante du voltage pouvant s'expliquer par plusieurs mécanismes de régulation, nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux modifications transcriptionnelles et traductionnelles.

Effet des acides gras sur l'expression du Na_V

Il est connu que les acides gras en interagissant avec des facteurs de transcription peuvent moduler l'expression de certains gènes (Larsson *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2006). Nous avons donc comparé par RT-PCR quantitative les effets de l'OA et du DHA sur la transcription du gène SCN5A codant le $Na_V1.5$. Nous avons également vérifié en western blot si la quantité totale de Na_V dans les cellules pouvait être modifiée par les acides gras (**Figure 45**).

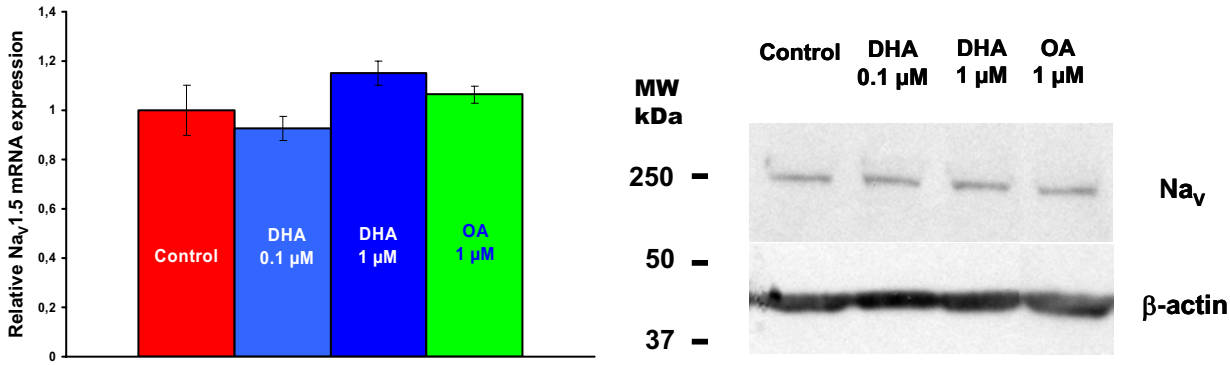


Figure 45 : Effet du traitement par les acides gras (OA et DHA) sur la transcription et l'expression protéique du Na_V. **A gauche, la quantité des ARN messagers du $Na_V1.5$ a été évaluée en RT-PCR quantitative. A droite, la quantité totale de Na_V dans les cellules a été évaluée par la technique de western blot (utilisation de l'anticorps Pan-Na_V). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la β-actine a servi de témoin de dépôt.**

La supplémentation du milieu de culture des cellules MDA-MB-231 pendant 5 jours avec 1 µM d'OA ou de DHA ne modifie pas l'expression des ARNm du $Na_V1.5$. La quantité de protéines Na_V ne semble pas non plus être modifiée par ces traitements.

Nous avons vu précédemment qu'il avait été proposé au travers de nombreuses études que l'effet des acides gras sur leurs protéines cibles, et en particulier les canaux ioniques, pouvait passer par leur incorporation dans les phospholipides membranaires et par la modification de la composition lipidique de certains domaines membranaires. Cette incorporation peut entraîner alors des modifications de la fluidité membranaire ayant pour conséquences des changements de localisation et/ou d'activité des protéines qui sont en relation directe avec les lipides membranaires. Ainsi, Schley et collaborateurs ont montré que l'apport d'EPA + DHA (100 µM) aux cellules MDA-MB-231 pendant 72 h, permettait de diminuer la quantité de récepteurs à l'EGF localisés dans les radeaux lipidiques (Schley *et al.*, 2007). Nous avons alors cherché à savoir si le traitement de ces cellules pendant cinq jours avec une concentration beaucoup plus faible de DHA (1 µM au lieu des 100 µM d'EPA+DHA utilisés) pouvait avoir un tel effet sur la localisation des canaux Na_V.

Effet du DHA sur la localisation du Na_V

La délocalisation possible des protéines en dehors des radeaux lipidiques semble être une conséquence de l'incorporation des AGPI n-3 dans la membrane, aussi nous avons vérifié dans un premier temps que la supplémentation du milieu de culture des cellules MDA-MB-231 avec du DHA à 1 µM entraînait bien une incorporation de cet acide gras dans les phospholipides membranaires. Après avoir récolté et identifié les différentes fractions membranaires séparées par ultracentrifugation sur gradient de saccharose (*cf.* matériel et méthodes + Figure 47), les lipides totaux ont été extraits et les phospholipides séparés par chromatographie sur couche mince. Les acides gras composant ces phospholipides ont alors été analysés par chromatagraphie en phase gazeuse. La proportion de DHA parmi ces acides gras lorsque les cellules ont été traitées ou non avec 1 µM de DHA est représentée dans la **figure 46**.

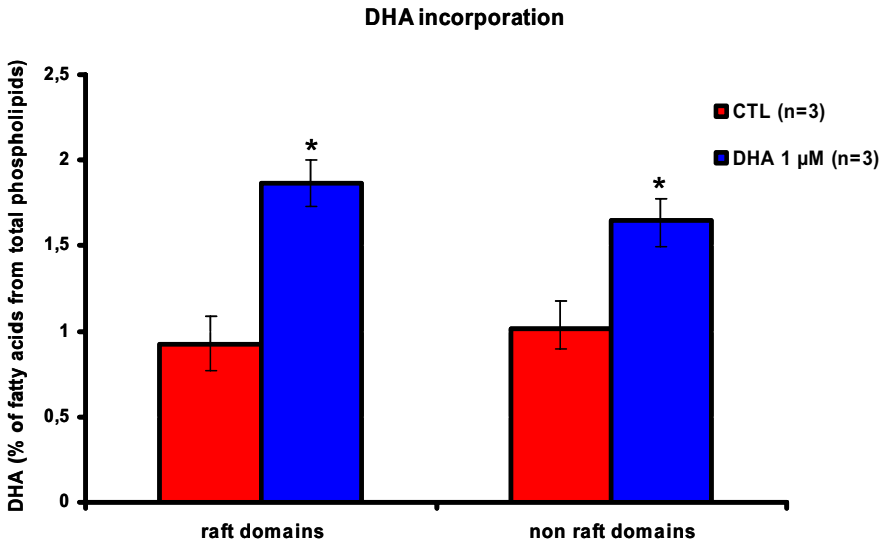


Figure 46 : Incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires des cellules MDA-MB-231 après 5 jours de supplémentation du milieu de culture avec 1 µM de DHA. **Les acides gras des phospholipides totaux ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont exprimés en pourcentage de DHA parmi l'ensemble des acides gras des phospholipides totaux. L'utilisation d'anticorps spécifiques nous a permis d'identifier les fractions comprenant les radeaux lipidiques (raft domains) et les fractions contenant le reste de la membrane plasmique (non-raft domains). * différence significative (p<0,05). n : nombre d'expériences.**

Nous constatons que la proportion de DHA est augmentée de manière significative ($p<0,05$) dans les radeaux lipidiques (1,86 ± 0,14 % *vs.* 0,93 ± 0,16 %) comme dans les domaines membranaires non radeaux lipidiques (1,65 ± 0,13 % *vs.* 1,02 ± 0,16 %) quand les cellules sont cultivées dans un milieu enrichi en DHA, par rapport à celles cultivées dans un milieu normal. L'augmentation semble toutefois être un peu plus importante dans les radeaux lipidiques.

Nous avons donc cherché à savoir si l'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires pouvait modifier la localisation du Na_V. L'analyse en western blot des fractions collectées après séparation par ultracentrifugation sur gradient de saccharose nous a permis d'identifier les microdomaines membranaires et de définir la localisation du Na_V (**Figure 47**).

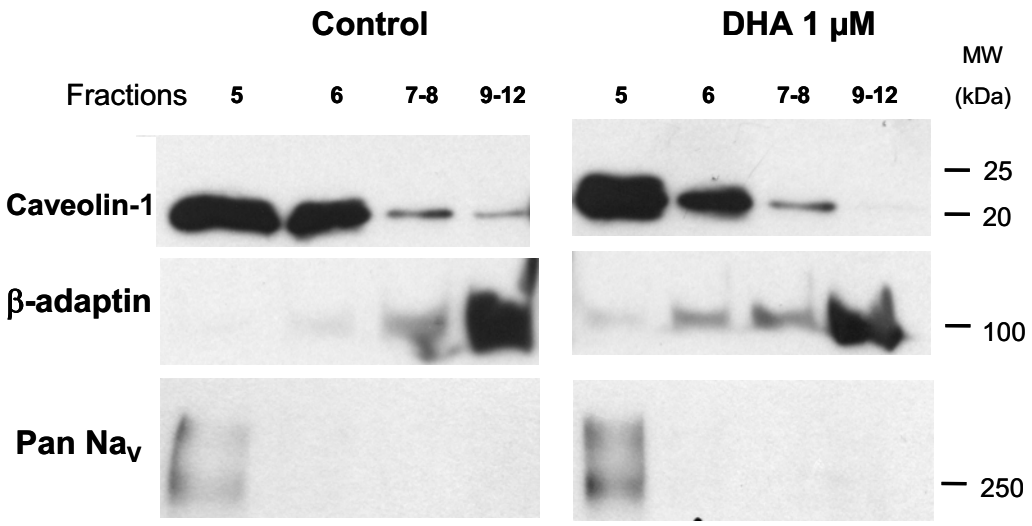


Figure 47 : Effet du DHA sur la localisation du Na_V. **L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la cavéoline-1 nous a permis d'identifier les fractions correspondant aux cavéoles (fractions 5 et 6), un type de radeaux lipidiques particuliers. Les domaines membranaires non radeaux lipidiques ont été identifiés avec l'anticorps dirigé contre la β-adaptine.**

La figure 47 représente un exemple de résultat obtenu en western blot : on remarque que le Na_V est retrouvé uniquement dans les fractions qui contiennent la cavéoline mais pas la β-adaptine. Cette localisation ne semble pas être modifiée lorsque les cellules sont traitées avec 1 µM de DHA. Cependant, parmi les expériences réalisées, trop peu ont permis d'obtenir un signal détectable de Na_V pour être correctement quantifié.

C. Discussion

De nombeuses études *in vitro* ont montré que les AGPI n-3 pouvaient inhiber le développement du cancer du sein en modulant les phénomènes d'inflammation, la prolifération cellulaire, l'apoptose, les métastases et l'angiogenèse (Larsson *et al.*, 2004). De nombreux mécanismes d'action et de nouvelles cibles potentielles, comme les canaux ioniques, ont été proposés (Jude *et al.*, 2006). Nous nous sommes donc intéressés, à travers cette étude, aux effets de l'apport sur une longue durée (5 jours) de faibles concentrations de DHA (1µM) sur la régulation des courants sodiques impliqués dans l'invasivité des cellules MDA-MB-231.

Nous avons montré dans un premier temps que le traitement chronique des cellules avec des concentrations en DHA de l'ordre de 30 µM entraînait une diminution de la prolifération. Ces résultats sont en accord avec ce qui avait été précédemment observé au laboratoire (Barascu *et al.*, 2006). Un tel effet n'est pas retrouvé lorsque les cellules sont traitées avec des concentrations identiques d'acide oléique (OA), un acide gras mono-insaturé. Cependant pour des concentrations de l'ordre de la centaine de micromolaires, l'OA semble exercer un effet antiprolifératif, voire cytotoxique, ce qui suggère que pour des concentrations élevées il existe un effet qui n'est plus spécifique des AGPI n-3, mais plutôt des acides gras insaturés (à longue chaîne) en général. A 1 µM, l'OA comme le DHA n'ont aucun effet sur la prolifération cellulaire et cette concentration peut alors être utilisée pour étudier l'effet de ces acides gras sur la migration et l'invasion cellulaire. Nous avons alors montré que le traitement des cellules avec ces acides gras ne modifiait pas la capacité de migration des cellules. En revanche, le DHA entraîne une diminution significative de l'invasivité des cellules. Cet effet avait déjà été obtenu dans des expériences réalisées précédemment au laboratoire avec une concentration de 10 µM (thèse de S. Roger, 2005). Nous avions montré par ailleurs que l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-468 qui ne possèdent pas le Na_V n'était pas affectée par cette concentration de DHA. D'autre part, l'inhibition de l'activité du Na_V par la TTX chez les cellules pré-traitées au DHA n'entraîne pas de réduction supplémentaire de l'invasion. Ceci suggère que l'effet inhibiteur du DHA pourrait passer par une régulation du Na_V.

L'effet du traitement des cellules avec 1 µM de DHA sur les propriétés électrophysiologiques du Na_V a donc été testé. L'application en aigu de cet acide gras sous forme d'ester méthylique n'a aucun effet sur le courant sodique. Ces résultats concordent avec ceux publiés par l'équipe d'Alexander Leaf sur le $Na_V1.5$ (Xiao *et al.*, 1998). Nous n'avons pas testé l'application aiguë de DHA sous forme d'acide gras libre dans le cadre de cette étude, toutefois l'équipe de Mustafa Djamgoz s'y est déjà intéressée (Isbilen *et al.*, 2006). Ils ont montré en effet que l'application de DHA bloquait le courant sodique des cellules MDA-MB-231 de manière dose-dépendante. Ils n'expliquent pas cependant par quel mécanisme le DHA agit, mais proposent que ce puisse être par interaction directe avec les sous-unités α et/ou β du Na_V, plus que par une modification de la fluidité membranaire, étant donnée la reversibilité rapide de l'effet par lavage avec le PSS. Nous pensons que dans leurs conditions expérimentales un effet de la lipoperoxydation ne peut pas être exclu et qu'il pourrait expliquer les différences observées entre les effets de l'application du DHA sous forme

d'acides gras libres (ou sels de sodium) et d'esters méthyliques (Jude *et al.*, 2003). Nous avons par la suite étudié l'effet de la supplémentation des cellules pendant 5 jours avec du DHA ou de l'OA. Pour des doses de l'ordre du micromolaire, le DHA réduit le courant sodique de presque 60 % alors que l'OA n'a pas d'effet. Cette inhibition semble être dose-dépendante, mais étant donnée la variabilité des courants pour une même condition et le faible nombre de cellules pour certaines doses testées, nous n'avons pas pu le confirmer d'un point de vue statistique. Pour une concentration de 10 µM, l'OA a, de manière surprenante, autant d'effet que le DHA. Ainsi au-delà d'une certaine concentration on ne peut plus parler d'effet inhibiteur du Na_V, spécifique des AGPI n-3, puisqu'il est également observé pour un AGMI n-9. On peut supposer que cet effet puisse être dû à l'incorporation importante des acides gras dans les phospholides membranaires, qui vont alors perturber un certain équilibre entre les acides gras saturés, les acides gras mono-insaturés et les acides gras poly-insaturés, et entraîner une modification de la stabilité membranaire. Les acides gras poly-insaturés sont également connus pour être sensibles à la peroxydation, principalement liée au fait qu'ils possèdent des doubles liaisons au niveau de leur chaîne hydrocarbonée. On peut alors facilement imaginer que plus on augmente l'indice d'insaturation global de la membrane, plus la sensibilité à la peroxydation va être importante. Ainsi, dans le cas d'un apport de concentrations élevées (>10 µM) d'acides gras poly- mais également mono-insaturés, cet indice d'insaturation pourrait augmenter significativement, ce qui favoriserait alors des réactions de lipoperoxydation qui auraient pour conséquence finale la modification d'activité de certaines protéines membranaires comme les canaux ioniques. Des modifications transcriptionnelles ou traductionnelles du Na_V peuvent également être mises en cause.

Le traitement sur plusieurs jours des cellules MDA-MB-231 avec 1 µM de DHA semble également modifier de manière significative la disponibilité voltage-dépendante des canaux sodiques, puisque la relation disponibilité-voltage est déplacée de 9 mV vers des potentiels plus dépolarisés. Ce résultat est surprenant car il est en contradiction avec ce qui a été rapporté dans la littérature, que ce soit par l'équipe de Leaf sur le Na_V cardiaque, ou par d'autres équipes comme par exemple Jo et collaborateurs qui ont étudié le Na_V dans les cellules musculaires lisses bronchiques (Jo *et al.*, 2005). A chaque fois, c'est en effet un décalage de la courbe de disponibilité vers des potentiels hyperpolarisés qui a été décrit. Cependant les modèles étudiés sont différents, tout comme les conditions expérimentales et probablement les conditions de culture cellulaire. De nombreux facteurs peuvent dès lors entrer en jeu dans cette régulation, parmi lesquels nous pouvons citer : les facteurs de

croissance du sérum du milieu de culture, la durée du traitement des cellules par les acides gras et la forme sous laquelle ils sont apportés, l'expression d'isoformes particulières de sous-unités β régulatrices en fonction des cellules étudiées, l'isoforme de la sous-unité α étudiée (rappelons que selon l'équipe de Djamgoz, c'est l'isoforme néonatale du $Na_V1.5$ qui est exprimée dans les cellules MDA-MB-231), *etc*… Par ailleurs il est important de noter que l'étude des propriétés électrophysiologiques des canaux Na_V a été réalisée avec la technique de patch-clamp en configuration "patch rompu". Si cette régulation fait intervenir des seconds messagers intracellulaires, l'effet du DHA sur la disponibilité pourrait être confirmé ou infirmé par l'utilisation de la technique de "patch-perforé" qui permet de conserver les éléments régulateurs comme les protéines kinases, qui sont dilués par le milieu intrapipette en configuration "patch rompu" (Liu and Kennedy, 1998). Le DHA semble également entraîner un déplacement du potentiel de membrane des cellules d'une dizaine de millivolts vers des valeurs positives, cette différence n'étant toutefois pas statistiquement significative, probablement à cause de la variabilité des valeurs et du faible nombre d'échantillons. Cependant si cette différence est réelle, cela pourrait signifier que le DHA peut affecter d'autres conductances que les canaux Na_V. On peut penser entre autres aux canaux ENaC (epithelial sodium channel) ou ASIC (acid-sensing ion channel), qui ont déjà été décrits comme étant impliqués dans la migration de cellules de glioblastome (Kapoor *et al.*, 2009). Les ENaC peuvent être exprimés dans les cellules épithéliales mammaires (Boyd and Naray-Fejes-Toth, 2007) et ils sont également connus pour être régulés par les AGPI n-3 (Mies *et al.*, 2004).

Si les résultats concernant l'effet du DHA sur la disponibilité du Na_V ne concordent pas avec les études que l'on peut retrouver dans la littérature, l'effet de diminution des courants sodiques après une application de courte durée (quelques minutes) lorsque le DHA est apporté sous forme acide gras libre, ou de longue durée (quelques jours) lorsqu'il est apporté sous forme d'ester méthylique, semblent faire l'unanimité. Nous avons donc cherché à savoir si cette diminution pouvait être due à une modification de l'expression du Na_V, que ce soit au niveau du transcrit ou de la protéine. Nous avons alors montré en RT-PCR quantitative et en western blot que ni la quantité d'ARNm, ni la quantité de protéine n'était modifiée par le traitement DHA 1 µM. Si l'équipe de Djamgoz n'a pas rapporté d'effet de l'apport de DHA 0,5 µM sous forme d'acide gras libre sur l'activation ou la disponibilité du Na_V, elle a montré en revanche que l'application de cette même concentration avait un effet en chronique (48-72 h), et que cette régulation du Na_V passait par une diminution de l'expression des ARNm du

$Na_V1.5$ néonatal et de la protéine membranaire. Ces résultats diffèrent des nôtres mais peuvent s'expliquer par le fait que le DHA apporté sous forme d'acide gras libre peut être plus sensible à la lipoperoxydation, et que l'effet observé soit en partie dû à l'action des produits dérivés de la lipoperoxydation, qui pourraient moduler l'action des régulateurs de la transcription de certains gènes. Il serait donc intéressant de pouvoir réaliser ces mêmes expériences en présence d'anti-oxydants (vitamine C, tocophérol, *etc*...) ou de pro-oxydants (H_2O_2).

Nous avons alors pensé que l'effet du DHA sur le Na_V pouvait passer par un mécanisme autre qu'une régulation transcriptionnelle ou traductionnelle de cette protéine. En nous basant sur les travaux de Schley et collaborateurs (Schley *et al.*, 2007) qui montraient que des concentrations élevées d'AGPI n-3 (de l'ordre de 100 µM) pouvaient entraîner une délocalisation des récepteurs à l'EGF en dehors des radeaux lipidiques, nous avons initié une collaboration avec le Docteur Sarah Calaghan de l'Université de Leeds (Royaume Uni) afin de développer au laboratoire une technique permettant d'étudier les microdomaines membranaires. Plusieurs méthodes ont été précédemment décrites pour ce type d'étude, basées ou non sur l'insolubilité des radeaux lipidiques dans le triton X-100 (Ostrom and Liu, 2007). Nous avons choisi d'utiliser une technique sans détergent, qui permet de conserver dans les radeaux lipidiques certaines protéines qui sont habituellement perdues avec les méthodes faisant intervenir des détergents (Smart *et al.*, 1995). Cette technique nous a permis de mettre en évidence une localisation du Na_V dans les fractions contenant la cavéoline-1. L'apport de DHA aux cellules ne semble pas modifier cette localisation et cette absence d'effet pourrait s'expliquer par le fait que la concentration de DHA utilisée dans notre étude est cent fois plus faible que celle utilisée par Schley *et al.*

Les canaux Na_V semblent donc être localisés, pour la majorité, dans les radeaux lipidiques, et en particulier dans les cavéoles. Il pourrait être intéressant de vérifier cette hypothèse par une autre méthode d'extraction, par exemple en utilisant un tampon contenant du triton X-100. L'utilisation d'anticorps dirigés contre d'autres protéines considérées comme des marqueurs de radeaux lipidiques (par exemple la flotilline) pourrait permettre également de valider les résultats obtenus avec l'anticorps anti-cavéoline-1. Une approche différente pourrait être également réalisée par l'étude en microscopie confocale des cellules marquées avec des anticorps fluorescents dirigés contre le Na_V et un marqueur des radeaux lipidiques. D'autre part, il apparaît important dans notre cas de pouvoir utiliser un anticorps spécifique du $Na_V1.5$ au lieu de l'anticorps Pan-Na_V qui reconnaît un motif commun à toutes les isoformes

de Na_V, sur la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV (les anticorps anti-$Na_V1.5$ qui ont été testés jusqu'à présent n'ayant pas apporté de résultat satisfaisant). Il a en effet été montré au laboratoire que les cellules MDA-MB-231 exprimaient des ARNm codant pour les isoformes $Na_V1.5$ et $Na_V1.7$ (qui est une isoforme TTX-sensible) (Jude *et al.*, 2006), mais que selon la caractérisation pharmacologique, seul le $Na_V1.5$ (TTX-résistant) était fonctionnel (Roger *et al.*, 2003). Il n'est donc pas exclut que la protéine $Na_V1.7$ soit présente dans les cellules, mais non fonctionnelle. Ceci pourrait par ailleurs expliquer la présence des deux bandes observées aux alentours de 250 kDa sur la figure 47. En effet, il est décrit que l'isoforme $Na_V1.5$ chez l'homme est constituée de 2016 acides aminés, alors que l'isoforme $Na_V1.7$ n'est constituée que de 1977 acides aminés (Catterall *et al.*, 2005), des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation pouvant également jouer sur le poids moléculaire ainsi que sur la fonction de la protéine. D'autre part une des limites de la technique que nous avons utilisée pour l'étude des radeaux lipidiques est que nous ignorons pour le moment dans quelles fractions sont retrouvées les endo-membranes. Il a été décrit que des microdomaines de type radeaux lipidiques pouvaient se former au niveau de l'appareil de Golgi (Helms and Zurzolo, 2004), aussi on peut penser que si le Na_V est également localisé dans les radeaux lipidiques des endomembranes et que le DHA modifie son adressage à la membrane plasmique, nous ne pourrions détecter cet effet avec notre technique. Ainsi il nous paraît intéressant de pouvoir se procurer différents anticorps dirigés contre des protéines des membranes nucléaires, du RE, du Golgi, *etc*… afin d'identifier dans quelles fractions extraites par ultracentrifugation sur gradient de saccharose les endomembranes vont être retrouvées.

Nous n'avons donc pas observé de changement de localisation du Na_V suite à l'incorporation de DHA dans les phospholipides membranaires. Nous pensons cependant que cette incorporation peut avoir un effet direct sur l'activité du Na_V. Il a en effet été montré que la déplétion des membranes en cholestérol pouvait modifier les propriétés électrophysiologiques du Na_V (Lundbaek *et al.*, 2004). Il conviendrait donc de vérifier si l'incorporation de DHA entraîne une modification de la concentration en cholestérol dans les différents domaines membranaires. Cette incorporation pourrait également modifier les proportions des différentes classes de phospholipides qui conditionnent l'attachement aux protéines et au cholestérol.

Les résultats obtenus en ce qui concerne les modifications de la densité de courant sodique et de la disponibilité dépendante du voltage peuvent nous laisser supposer que le DHA pourrait également moduler l'activité de protéines régulatrices du Na_V, comme les sous-

unités β ou des protéines kinases (PKA ou PKC). Nous avons en effet montré que les ARNm codants pour les isoformes β1, β2 et β4 étaient exprimés dans les cellules MDA-MB-231 (Gillet *et al.*, 2009) et l'utilisation tout dernièrement d'anticorps spécifiques nous a permis de confirmer la présence de ces protéines (Mémoire de Master 2 de V. Driffort, 2010). La présence ainsi que l'activité de la protéine kinase A ont été également mises en évidence dans ces cellules (Chioni *et al.*, 2010). Dans une étude réalisée précédemment au laboratoire, il a été montré qu'un régime enrichi en huiles de poissons induisait une modification de la composition en acides gras des phospholipides membranaires des cellules cardiaques, associée à une modification de l'activation de différentes isoformes de PKC, qui se traduit par la translocation des PKC du cytosol vers la membrane plasmique (Jude *et al.*, 2007). L'effet du DHA sur les courants sodiques des cellules MDA-MB-231 pourrait de la même manière passer par une modification de l'activation de différentes isoformes de PKC. Nous avons commencé à nous intéresser à ces protéines. Nous avons montré dans un premier temps par RT-PCR que les ARNm des PKC α, δ, ε, η, ι, et ζ étaient retrouvés dans les cellules MDA-MB-231. Une première analyse en Q-PCR n'a pas mis en évidence d'effet du DHA sur l'expression des isoformes α, δ, η et ι, en revanche l'expression de la PKC ε semblait être augmentée d'environ 75 %. Ces résultats sont cependant très préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Nous avons également débuté des expériences de western blot visant à déterminer l'effet du DHA sur les quantités de PKC α, δ, ε et ι, retrouvées d'une part dans les différentes fractions récoltées après ultracentrifugation sur gradient de saccharose, et sur leur répartition dans les fractions solubles (assimilées à une localisation cytosolique) et particulaires (assimilées à une forme liée aux membranes) (*cf.* matériel et méthodes). Ces expériences préliminaires ne permettent pas pour le moment d'attribuer un effet du DHA sur la localisation des PKC, cependant l'utilisation d'anticorps spécifiques nous a permis de confirmer que ces 4 isoformes sont bien présentes dans les cellules MDA-MB-231. Il pourrait par ailleurs être envisageable d'évaluer l'effet du DHA sur l'activité PKC des cellules, en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques des différentes isoformes.

En conclusion, nous avons montré que le traitement des cellules MDA-MB-231 sur plusieurs jours avec des concentrations de DHA (1 μM) qui n'affectent pas la prolifération ni la migration des cellules, pouvait inhiber l'invasivité cellulaire. Cet effet semble passer par une régulation spécifique de l'activité du Na_V (diminution de la densité de courant et modification de la disponibilité). Nous n'avons dans un premier temps pas observé d'effet du DHA sur la régulation de la quantité d'ARNm et de protéines Na_V. Nous nous sommes alors

intéressés aux effets de la modification de l'environnement lipidique membranaire sur la localisation du Na_V. L'analyse en western-blot des microdomaines membranaires nous a permis de mettre en évidence une localisation du Na_V dans les domaines contenant la cavéoline-1, un marqueur des radeaux lipidiques particuliers que sont les cavéoles. Le traitement des cellules avec une faible concentration de DHA ne semble pas altérer cette localisation. Ainsi, nous pensons que l'effet chronique du DHA peut passer par son incorporation dans les phospholipides membranaires. Cette modification de la composition lipidique peut alors entraîner un changement de la fluidité de certains domaines membranaires et avoir une conséquence directe sur l'activité des canaux Na_V qui y sont localisés. Nous pensons que les AGPI n-3 pourraient également moduler l'action de protéines régulatrices du Na_V comme les protéines kinases PKA et PKC ou les sous-unités β. Nous proposons donc à travers cette étude une nouvelle voie par laquelle les AGPI n-3 pourraient exercer leur action inhibitrice sur le développement des tumeurs et des métastases. Cependant, les mécanismes de régulation par le DHA des canaux sodiques voltage-dépendants impliqués dans l'invasivité des cellules cancéreuses sont encore à déterminer.

Conclusions générales et perspectives

L'expression et la fonctionnalité de canaux sodiques voltage-dépendants (Na_V) sont associées au caractère invasif de certains cancers métastatiques (sein, prostate, poumon, *etc.*…) et ces canaux pourraient en ce sens constituer des cibles thérapeutiques potentielles contre le développement de tumeurs secondaires (Le Guennec *et al.*, 2007; Roger *et al.*, 2006). Les mécanismes par lesquels les canaux Na_V peuvent réguler l'invasivité des cellules cancéreuses sont cependant encore mal connus. Ces canaux sont classiquement décrits comme étant responsables de l'excitabilité cellulaire dans les cellules musculaires cardiaques et nerveuses, c'est-à-dire qu'ils sont impliqués dans le déclenchement et la propagation de potentiels d'action. Toutefois, le potentiel de membrane des cellules cancéreuses qui expriment ces canaux est plus dépolarisé (entre -50 et -30 mV selon les lignées étudiées) que celui des cellules excitables (-70 à -85 mV), ce qui suggère, d'après leurs propriétés électrophysiologiques, que les canaux sodiques sont en partie inactivés (le potentiel moyen de demi-inactivation se situant entre -60 à -40 mV). Ainsi, nous ne pensons pas qu'en conditions physiologiques les courants sodiques de ces cellules soient suffisamment importants pour pouvoir être impliqués dans le déclenchement de potentiels d'action spontanés. Les études menées au laboratoire sur les lignées de cellules cancéreuses mammaires et pulmonaires ont montré que le potentiel de membrane de ces cellules est en fait localisé dans une fenêtre de voltage où les canaux sodiques sont partiellement activés et pas complètement inactivés, ce qui se traduit par la présence d'un courant dit de "fenêtre" qui est responsable d'une entrée continue de sodium dans les cellules (Roger *et al.*, 2003; Roger *et al.*, 2007). Lorsque ce courant est inhibé par un bloqueur spécifique, la TTX, l'invasivité des cellules (qui correspond à leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire (MEC) afin de pouvoir migrer) est réduite de manière significative. Le premier objectif de cette thèse a donc consisté à comprendre comment certaines protéases impliquées dans la dégradation de la MEC pouvaient être régulées par le Na_V. Nous avons montré que les principales protéases impliquées dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, qui expriment l'isoforme $Na_V1.5$, sont les cathepsines à cystéine et notamment les cathepsines B et S. Leur inhibition entraîne une réduction importante de l'invasivité des cellules et l'inhibition concomitante du Na_V ne provoque pas de diminution supplémentaire, suggérant alors que l'activité de ces cathepsines peut être régulée par le Na_V. Des résultats similaires ont par ailleurs été obtenus sur des lignées cellulaires de cancer du poumon. Nous avons montré par la suite que l'inhibition des courants sodiques n'entraîne pas de modification de l'expression des différentes cathepsines ou de leurs inhibiteurs endogènes (les cystatines), ni de leur sécrétion. En revanche, le blocage du Na_V par la TTX provoque une acidification intracellulaire et une

alcalinisation du pH périmembranaire. Cela suggère que lorsqu'il est actif, le Na_V est responsable d'une acidification périmembranaire, favorable à l'activation des cathepsines.

Nous n'avons pas encore déterminé par quels mécanismes les régulateurs du pH cellulaire peuvent être modulés par l'activité du Na_V. Cependant de récents travaux menés au laboratoire suggèrent que l'échangeur sodium-proton NHE1 pourrait être impliqué. Nous avons montré par ailleurs que le Na_V, le NHE1 et la cavéoline-1 sont retrouvés dans les mêmes fractions de membranes isolées par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, ce qui suggère que ces protéines pourraient être co-localisées dans des microdomaines membranaires particuliers que sont les cavéoles. Afin de confirmer ces résultats nous prévoyons d'étudier cette localisation en microscopie confocale. L'article de Bourguignon et collaborateurs permet d'appuyer cette hypothèse puisque cette équipe a montré que la glycoprotéine CD44 et l'échangeur NHE1 sont retrouvés dans les radeaux lipidiques riches en cholestérol et en gangliosides, et que leur interaction entraînerait l'acidification du microenvironnement extracellulaire et la maturation des cathepsines B impliquées dans l'invasion cellulaire (Bourguignon *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été proposé que la capacité des cellules cancéreuses à dégrader les matrices extracellulaires était associée avec la localisation des cathepsines à cystéine au niveau des cavéoles (Mohamed and Sloane, 2006). Ainsi, la pro-cathepsine B pourrait s'associer aux cavéoles par une interaction directe avec la chaîne légère de l'hétérotétramère d'annexine II, une protéine qui joue un rôle structural lorsqu'elle est localisée dans les microdomaines membranaires. Nous pensons donc que le regroupement de tous ces acteurs (Na_V, NHE1, pro-cathepsine B) dans les cavéoles pourrait favoriser leur interaction, directe ou par des voies de signalisation très localisées, potentialisant ainsi l'invasivité des cellules cancéreuses. Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour valider ce concept. Si l'acidification périmembranaire se fait de façon très localisée il doit être possible de la mesurer de manière plus précise, en utilisant par exemple la toxine cholérique couplée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine), qui se fixe spécifiquement sur le lipide GM1 au niveau des cavéoles (Parton, 1994), ou bien avec des sondes lipidiques fluorescentes sensibles au pH qui s'intègreraient préférentiellement au niveau des cavéoles. Si la compartimentation de tous ces acteurs dans des microdomaines membranaires est importante pour la régulation de l'activité des cathepsines à cystéine, peut être cette localisation particulière influence-t-elle également le fonctionnement des canaux et des échangeurs. Ainsi il serait intéressant de pouvoir étudier l'activité du Na_V ou du NHE lorsque l'on destructure les microdomaines, en utilisant par exemple la méthyl-β-

cyclodextrine pour dépléter les membranes en cholestérol, des effets ayant déjà été démontrés dans d'autres modèles cellulaires (Lundbaek *et al.*, 2004; Tekpli *et al.*, 2008). Nous n'avons pour le moment aucune idée de la nature de l'interaction fonctionnelle entre le Na_V et le NHE. S'agit-il d'une interaction directe entre les deux protéines ou *via* des protéines régulatrices (*cf.* Abriel, 2010 pour revue) ? Ceci pourrait être étudié par exemple en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation. Une régulation directe de l'homéostasie sodique par le NHE1 est difficile à imaginer ; ce dernier utilisant le gradient de sodium pour échanger un H^+ intracellulaire contre un Na^+ extracellulaire, une augmentation locale de la concentration en Na^+ intracellulaire devrait avoir pour conséquence une réduction de l'extrusion des protons. En revanche des protéines telles que les échangeurs Na^+/Ca^{2+} pourraient servir d'intermédiaires. En effet la présence de ces échangeurs a été décrite dans les cellules MDA-MB-231; ils sont fonctionnels et sont impliqués dans la régulation de l'invasion apportée par les courants sodiques (thèse de S. Roger, 2005). Nous ne savons pas si ces échangeurs sont présents dans les cavéoles, mais si c'était le cas, on pourrait imaginer que la régulation de l'homéostasie sodique par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} puisse conduire à une augmentation très localisée de Ca^{2+} intracellulaire. Il est alors connu que des protéines fixant le calcium comme la CHP1 (calcineurin homologous protein 1) sont capables de moduler la sensibilité du NHE1 au pH intracellulaire et par conséquent son activité (Pang *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été proposé qu'en entraînant une augmentation de la concentration en sodium intracellulaire, le Na_V puisse réguler la PKA (Chioni *et al.*, 2010). Or, il a été décrit que l'invasivité des cellules cancéreuses, dépendante du NHE1, pouvait être régulée par la PKA, par la voie RhoA/ROCK1/MAPK14 ou PI3K (Cardone *et al.*, 2005). Ainsi, la régulation de l'invasivité des cellules MDA-MB-231 dépendante du $Na_V1.5$ pourrait passer par l'activation du NHE1, de manière directe ou indirecte, qui entraînerait alors une acidification périmembranaire très localisée favorisant l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine. Un schéma permettant de récapituler ces mécanismes potentiels est présenté dans la **figure 48**. Ce mécanisme pourrait être généralisé à l'ensemble des cellules cancéreuses qui expriment le Na_V, et il serait intéressant de pouvoir le confirmer en particulier dans les cellules cancéreuses pulmonaires et prostatiques, dans lesquelles nous avons déjà observé que l'invasivité dépendante du Na_V pouvait impliquer la régulation de certaines cathepsines. Il est important de préciser par ailleurs que le NHE1 n'est pas le seul régulateur du pH cellulaire à être fonctionnel dans les cellules MDA-MB-231 ; les V-ATPases retrouvées dans la membrane plasmique de ces cellules ont également été décrites comme jouant un rôle notable dans l'invasion (Hinton *et al.*, 2009).

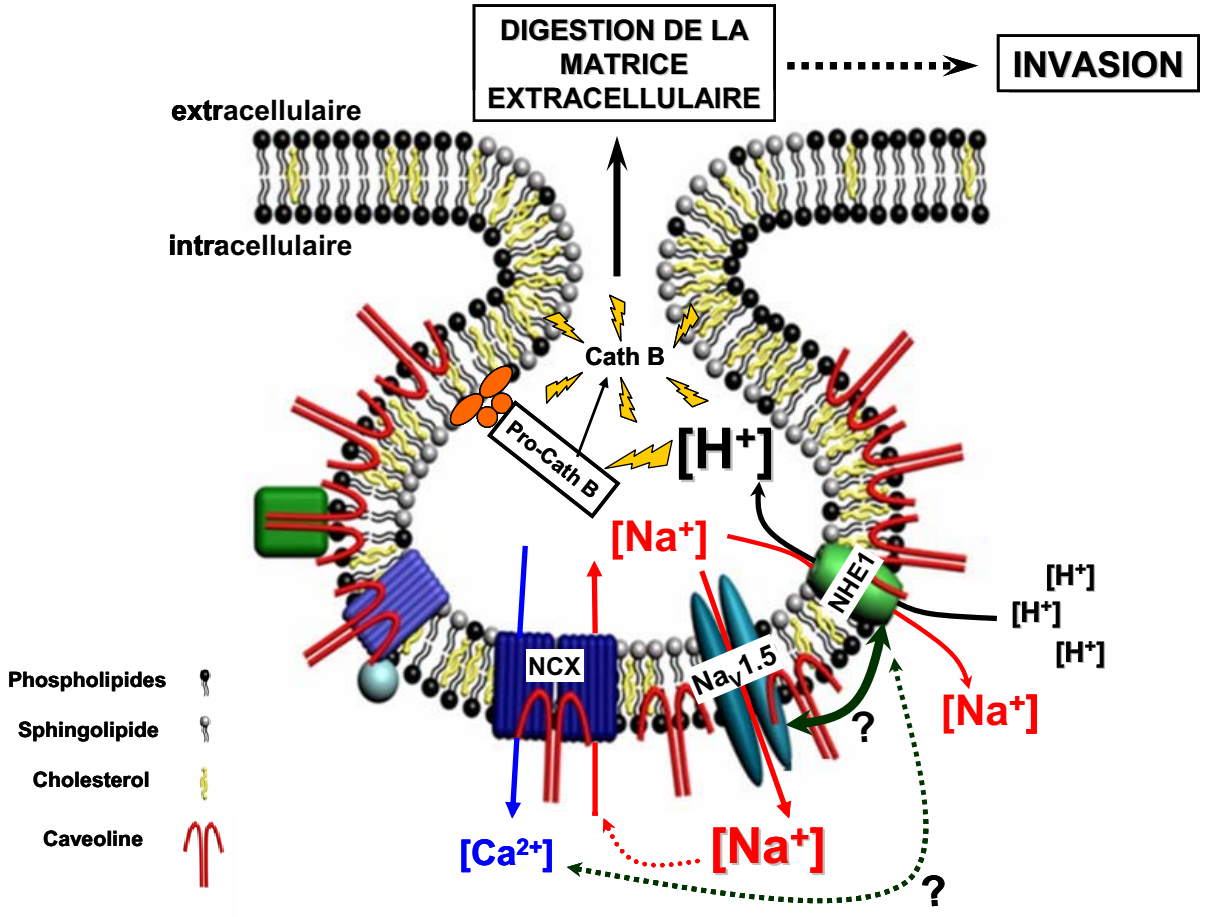


Figure 48 : Schéma récapitulatif des mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation de l'invasivité dépendante du $Na_V1.5$. **L'activité des canaux sodiques $Na_V1.5$ serait responsable de l'acidification de l'espace périmembranaire par le NHE1, au niveau des cavéoles. Cette acidification potentialiserait l'action des cathepsines, et en particulier la cathepsine B (Cath B), entraînant alors une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire et de l'invasivité cellulaire. La régulation du NHE1 par le $Na_V1.5$ pourrait se faire par interaction directe (ou par des protéines interagissant avec ces deux partenaires), ou *via* une régulation de l'homéostasie sodique par exemple par l'échangeur sodium-calcium (NCX).**

Si le Na_V est capable de réguler l'activité de différentes protéines impliquées dans l'invasivité des cellules cancéreuses, ce canal est également susceptible d'être lui-même régulé par certains facteurs de l'environnement extracellulaire ou par des éléments intracellulaires comme les PKA et les PKC (Chioni *et al.*, 2010; Roger *et al.*, 2004). Ainsi nous avons vu que des facteurs comme ceux contenus le SVF peuvent réguler son activité, et c'est aussi le cas de l'EGF ou de l'œstradiol (Ding *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2010). Ce type de régulation semble passer par divers effecteurs qui n'ont pas tous été identifiés, et qui pourraient réguler l'expression du Na_V mais aussi modifier ses propriétés électrophysiologiques. Ainsi il ne serait pas surprenant que les sous-unités auxiliaires β ou que d'autres protéines connues pour

interagir avec le Na_V (Shao *et al.*, 2009) puissent être impliquées. De manière assez intéressante, il a été décrit que les cellules MDA-MB-231 exprimaient des récepteurs β-adrénergiques, et en particulier le sous-type β2. Dans les cellules cardiaques, il a été montré que la localisation des récepteurs β2 dans les cavéoles permettait d'augmenter l'efficacité de leur couplage aux différents effecteurs membranaires (notamment par une voie AMPc-dépendante) avec lesquels ils sont compartimentés(Calaghan *et al.*, 2008). Ces récepteurs sont par ailleurs connus pour être impliqués dans la régulation de l'activité, *via* la PKA, de certains canaux ioniques et échangeurs (Xiao *et al.*, 1999). Ainsi, il serait intéressant de savoir si des ligands des récepteurs β2 (catécholamines et agents pharmacologiques) peuvent réguler l'activité du Na_V et modifier ainsi l'invasivité des cellules cancéreuses. Jusqu'à maintenant les recherches ont plutôt porté sur leur implication dans la croissance des populations cellulaires et il a été montré récemment que l'adrénaline diminuait l'apoptose des cellules MDA-MB-231 et des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et C4-2, par une voie implicant la PKA (Sastry *et al.*, 2007). D'autres récepteurs membranaires retrouvés dans les cellules cancéreuses sont connus pour réguler les canaux ioniques. C'est le cas en particulier du récepteur sigma-1 qui a été décrit comme pouvant réguler des canaux K^+ et Cl^- impliqués dans la prolifération de cellules cancéreuses (Renaudo *et al.*, 2004; Renaudo *et al.*, 2007). Ce sont des récepteurs localisés dans le réticulum endoplasmique et dans la membrane plasmique et sensibles à un grand nombre de molécules telles que les benzomorphanes, antipsychotiques, antidépresseurs, neurostéroïdes, *etc.*… Ces récepteurs ont par ailleurs été retrouvés dans les cellules MDA-MB-231 où ils semblent jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire et dans la structure des radeaux lipidiques par leur liaison au cholestérol (Palmer *et al.*, 2007). De plus, il semblerait que ces récepteurs régulent l'activité de $Na_V1.5$ dans les cardiomyocytes néonataux de souris (Johannessen *et al.*, 2009). Il pourrait donc être intéressant d'étudier s'il existe une relation entre le récepteur sigma-1 et le $Na_V1.5$ dans les cellules MDA-MB-231. L'étude des récepteurs sigma-1 comme des récepteurs β2-adrénergiques dans les cellules MDA-MB-231 mériterait donc d'être approfondie puisque ces protéines pourraient intervenir dans des mécanismes de régulation des canaux Na_V, constituant par la même occasion des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes.

Nous avons vu que si la présence de la sous-unité α du Na_V, responsable des différentes propriétés d'activation, de sélectivité ionique et d'inactivation, est nécessaire au fonctionnement du canal, les sous unités β peuvent également jouer un rôle dans l'expression et l'adressage du Na_V, ainsi que dans la régulation de ses propriétés électrophysiologiques.

Ces protéines peuvent par ailleurs servir de molécules d'adhésion, grâce à leur domaine extracellulaire de type immunoglobuline, et il a été montré que la sous-unité β1 en particulier pouvait être impliquée dans l'adhésion des cellules MDA-MB-231 (Chioni *et al.*, 2009). Nous pensons que les différentes isoformes de sous-unités β peuvent alors être également impliquées dans l'arrêt des cellules au niveau des tissus où elles développent des tumeurs secondaires. Nos études en PCR, et plus récemment en western blot, ont permis de montrer que les isoformes β1, β2 et β4 étaient présentes dans les cellules MDA-MB-231. Aussi nous avons pour projet d'étudier le rôle joué par ces différentes sous-unités dans la régulation du courant sodique, ainsi que dans la prolifération et l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Nous disposons de siRNA destinés à empêcher l'expression des sous-unités β1, β2 et β4. L'efficacité de ces siRNA a été confirmée en western blot et les premiers tests d'invasion ont débuté (Mémoire de Master 2 de V. Driffort, 2010).

Sachant que les canaux $Na_V1.5$ sont retrouvés dans des biopsies cancéreuses mammaires et que leur présence semble être associée au caractère métastatique (Fraser *et al.*, 2005), nous souhaiterions également déterminer dans un modèle *in vivo*, l'implication de ce canal dans la croissance de la tumeur primaire, l'apparition, le développement et la localisation des métastases. Pour cela nous projetons d'utiliser des lignées cellulaires génétiquement modifiées, exprimant ou non le canal sodique (lignées exprimant la luciférase et transduites par des vecteurs lentiviraux codant pour des shRNA (small hairpin RNA) dirigés contre les différentes sous-unités de $Na_V1.5$), dans un modèle murin de xénogreffe. L'expression de la luciférase par les cellules cancéreuses permettrait alors de suivre par bioluminescence (après injection de luciférine), avec une caméra, l'évolution de la tumeur primaire et de détecter le développement de foyers cancéreux secondaires. En collaboration avec les docteurs V. Joulin (FRE2939 CNRS, IGR, Villejuif) et C. Collin (Université - Inserm U966, Tours), nous avons donc développé dans un premier temps une lignée de cellules MDA-MB-231-Luc à partir des cellules MDA-MB-231 que nous utilisons pour nos différentes études, et que nous avons transduites avec des lentivecteurs porteurs du gène de la luciférase. Nous avons ensuite vérifié que les cellules MDA-MB-231-Luc obtenues possédaient bien les mêmes caractéristiques de prolifération, d'invasivité et d'expression du courant sodique que la lignée sauvage. La production du vecteur lentiviral exprimant un ARN interférant anti-$Na_V1.5$ (shRNA-$Na_V1.5$) et la caractérisation de la lignée MDA-MB-231-Luc transduite avec ce lentivecteur (effets sur le courant sodique, invasivité cellulaire), a été réalisée dans le cadre d'un stage de master 2 (Mémoire de Master 2 de V. Driffort, 2010). La

suite de ce projet consistera donc à produire des lentivecteurs codant pour des shRNA destinés à empêcher de façon stable l'expression des sous-unités β dans les cellules MDA-MB-231-Luc avant de passer à la partie *in vivo*. A l'inverse, le même type d'étude pourrait être mené, mais cette fois-ci en surexprimant dans des lignées épithéliales mammaires normales, ou cancéreuses mais faiblement invasives, le canal $Na_V1.5$ ainsi que les différentes sous-unités β. Pour valider l'hypothèse du courant de fenêtre, il pourrait être également intéressant de transfecter les cellules MDA-MB-231 avec des canaux potassiques qui contrôlent le potentiel de membrane, et qui permettraient alors, en déplaçant le potentiel de membrane initial des cellules vers un potentiel hyperpolarisé, de sortir de la zone de fenêtre de voltage du courant sodique, et d'observer ainsi les effets sur l'invasion.

Si notre hypothèse sur le rôle du Na_V dans les cellules cancéreuses est validée par ces modèles, ce canal pourrait devenir un marqueur clinique et une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer du sein à risque métastatique élevé. Les études réalisées par le groupe de Djamgoz ont montré, notamment dans les cancers du sein et de la prostate, que ce sont respectivement les isoformes néonatales de $Na_V1.5$ et $Na_V1.7$ qui sont exprimées. Ils proposent alors plusieurs approches permettant de cibler spécifiquement les Na_V des cellules cancéreuses, comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de thérapies basées sur les siRNA, d'agents pharmacologiques ou de neurotoxines spécifiques de ces isoformes néonatales (Onkal and Djamgoz, 2009).

Le fait que des isoformes néonatales de canaux sodiques soient exprimées dans des tissus épithéliaux cancéreux et associées aux propriétés de dégradation des matrices extracellulaires nous conduit par ailleurs à nous interroger sur le rôle du Na_V dans le développement. Il est connu en effet que certains gènes embryonnaires peuvent être ré-exprimés par les cellules cancéreuses (Monk and Holding, 2001), ce qui nous autorise à penser qu'au cours du développement embryonnaire, les phénomènes de migration cellulaire et de remodelage des tissus pourraient faire intervenir des mécanismes impliquant le Na_V, comme dans les cellules cancéreuses. Plusieurs isoformes de Na_V ont par ailleurs déjà été décrites comme étant associées au développement embryonnaire, que ce soit au niveau du cerveau pour le $Na_V1.3$ (Albrieux *et al.*, 2004) ou du coeur pour le $Na_V1.5$ (Chopra *et al.*, 2010). Ainsi l'expression du $Na_V1.5$ néonatal par les cellules MDA-MB-231 pourrait correspondre à une ré-expression d'une protéine impliquée dans le développement normal de l'épithélium mammaire, qui est décrit comme étant contrôlé par les hormones systémiques, des facteurs de croissance, et par la matrice extracellulaire (Taddei *et al.*, 2008; Teuliere *et al.*,

2005). La question serait alors de comprendre quels sont les évènements initiateurs de cette régulation d'expression de gènes. Des mutations de certains facteurs régulant la transcription du Na_V, comme le facteur REST (RE-1 Silencing Transcription factor) (Chong *et al.*, 1995) pourraient alors être impliquées. La régulation de l'expression des gènes du développement peut se faire également au niveau post-transcriptionnel, par des microRNAs, qui sont des petites séquences d'ARN (≈ 22 nucléotides) non codantes, qui d'une manière générale empêchent la traduction (Shivdasani, 2006). On pourrait alors imaginer qu'un défaut (mutation) au niveau de microRNAs contrôlant l'expression ou la répression du $Na_V1.5$, puissent être à l'origine de sa présence dans certaines cellules cancéreuses. L'identification de facteurs de transcription et de microRNAs régulant l'expression de $Na_V1.5$ pourrait donc représenter un nouveau champ d'investigation dans la compréhension des mécanismes conduisant à l'expression anormale de ce canal dans les cellules cancéreuses.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons montré que les AGPI n-3 comme le DHA pouvaient diminuer l'activité des canaux sodiques, lorsqu'ils sont apportés de manière chronique et à faible concentration (1 µM), et réduire ainsi l'invasivité des cellules MDA-MB-231. Cette régulation ne semble pas passer par une modification de l'expression de $Na_V1.5$, ni par une modification de sa localisation dans certains domaines membranaires. Nous n'avons par ailleurs pas observé d'effet lors de l'application aiguë de DHA. Des modifications de l'environnement membranaire lipidique des canaux Na_V pouvant avoir en revanche un effet direct sur leur activité, en modulant par exemple les forces de tension exercées par la bicouche lipidique sur le canal (Lundbaek *et al.*, 2004), nous souhaiterions vérifier si l'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires peut modifier la proportion de cholestérol dans les microdomaines membranaires (cavéoles), dans lesquels les canaux sodiques semblent être localisés. Cela devrait être réalisé sur les fractions membranaires collectées après séparation par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, à l'aide d'un kit de dosage du cholestérol (Amplex® RED Cholesterol Assay Kit, réf. A12216, Invitrogen, France). Cette incorporation pourrait avoir par ailleurs une influence sur les différentes classes de phospholipides membranaires (Jude *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1999; Zerouga *et al.*, 1996). Nous nous proposons donc d'étudier l'effet du DHA sur la composition en acides gras des différentes classes de phospholipides, séparées par chromatographie en couche mince, ainsi que sur la proportion de chaque classe de phospholipides dans les microdomaines membranaires. De telles modifications pouvant avoir des conséquences sur l'activation des

PKC (Jude *et al.*, 2007), connues pour réguler le Na_V, il serait intéressant de pouvoir poursuivre les expériences que nous avons menées sur la localisation des différentes isoformes de PKC. Par ailleurs nous souhaiterions pouvoir étudier l'effet d'activateurs et/ou d'inhibiteurs spécifiques des différentes isoformes de PKC, sur les courants sodiques ainsi que sur l'invasivité de cellules MDA-MB-231, traitées ou non au DHA. L'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre les différentes isoformes permettrait par ailleurs d'enrichir cette étude.

L'incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires pourrait donc entraîner une modulation indirecte de l'activité du Na_V. Des protéines autres que la PKC pourraient être impliquées dans cette modulation par le DHA. Ainsi il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquant la PKA, ces dernières pouvant être régulées par les AGPI n-3 (Mies *et al.*, 2007). Les changements observés en ce qui concerne la disponibilité des canaux sodiques pourraient par ailleurs s'expliquer par une régulation des sous-unités β du Na_V par le DHA. Nous prévoyons donc d'étudier prochainement en RT-PCR quantitative et en western blot l'effet du DHA sur les quantités d'ARNm et de protéines, des différentes sous-unités β (β1, β2, β4) retrouvées dans les cellules MDA-MB-231. Nous disposons désormais de siRNA dirigés spécifiquement contre ces différentes sous-unités. Ainsi, nous allons pouvoir étudier l'effet du DHA sur les courants sodiques et l'invasivité de cellules MDA-MB-231 qui n'expriment plus ces sous-unités β. Nous pourrons alors savoir si les effets du DHA sur le Na_V impliquent une sous-unité β en particulier. Nous prévoyons également d'affiner nos études électrophysiologiques en utilisant la configuration "patch perforé". Ceci devrait nous permettre de confirmer, ou d'infirmer, l'effet du DHA que nous avons observé sur la disponibilité des canaux sodiques ; notamment si cet effet passe par la régulation de messagers secondaires. Nous avons observé par ailleurs que le DHA pouvait modifier le potentiel de membrane des cellules, mais étant donné le faible nombre de cellules étudiées et la variabilité des résultats, la différence n'était pas statistiquement significative. En augmentant les effectifs dans notre étude, peut-être pourrons nous alors avoir une idée plus précise de l'effet du DHA sur le potentiel de membrane.

Nous avons vu par ailleurs que la spécificité d'effet du DHA pouvait dépendre de la concentration utilisée. La question de la pertinence, d'un point de vue physiologique, de la dose d'AGPI n-3 utilisée pour comprendre les mécanismes d'action de ces molécules a été abordée très récemment dans une revue (Kim *et al.*, 2010). Il apparaît évident que l'interprétation des données expérimentales doit tenir compte de la forme sous laquelle l'acide

gras est apporté, de la dose, ainsi que de l'incorporation préférentielle des acides gras dans certains domaines membranaires et intracellulaires. Ainsi, nous avons montré que pour une concentration de 1 μM, le DHA entraîne une diminution des courants sodiques alors que l'OA (un acide gras mono-insaturé) n'a pas d'effet. Pour une concentration de 10 μM, l'effet de l'OA sur le courant sodique devient identique à celui du DHA. Enfin, Schley et collaborateurs sont parvenus à voir un effet des AGPI n-3 sur la localisation du récepteur à l'EGF, pour une concentration de 100 μM. Nous pourrions réaliser nos expériences avec la même dose de DHA, afin de savoir si pour des concentrations élevées il est possible d'observer une délocalisation du Na_V en dehors des radeaux lipidiques. Il semble alors important de déterminer si dans ces conditions, l'incorporation du DHA dans les membranes cellulaires est similaire à celle observée chez les patientes recevant une supplémentation en AGPI n-3.

Si dans nos conditions nous n'avons pas vu d'effet du DHA sur la localisation du Na_V, un autre mécanisme devrait cependant être étudié, celui de l'adressage du Na_V à la membrane. En effet, la technique que nous avons utilisée pour étudier les radeaux lipidiques ne nous a pas permis de différencier les endomembranes. Cependant des protocoles spécifiques d'ultracentrifugation sur gradient de saccharose linéaire (20% → 40%) permettent de séparer les endomembranes de la membrane plasmique. Il serait donc intéressant de pouvoir mettre en place un tel protocole afin d'étudier si le DHA peut modifier l'adressage du Na_V du RE ou du Golgi vers la membrane plasmique.

Par ailleurs, il a été découvert récemment de nouveaux médiateurs de nature lipidique issus de l'oxygénation enzymatique de l'EPA et du DHA par les cyclooxygénases, les lipoxygénases et les cytochromes P450 (Schwab and Serhan, 2006). Ce sont les résolvines E, issues de l'EPA, ainsi que les résolvines D et les protectines, isssues du DHA. Ces molécules présentent des propriétés anti-inflammatoires, régulatrices du système immunitaire et neuroprotectrices, et elles sont actives à des concentrations de l'ordre du picomolaire (Hong *et al.*, 2003). Il a été proposé que les effets bénéfiques attribués aux AGPI n-3 dans le cancer puissent passer par ces nouveaux médiateurs, même si les mécanismes sont encore très mal connus (Gleissman *et al.*, 2010a). Différentes cibles de la résolvine E1 ont été décrites dans une revue récente (Seki *et al.*, 2009). Parmi celles-ci figurent des molécules d'adhésion comme les intégrines et les sélectines L, dont l'expression peut être diminuée par ce médiateur lipidique (Dona *et al.*, 2008). Ces protéines transmembranaires sont essentielles pour l'extravasation des leucocytes, mais elles sont également connues pour réguler certains canaux ioniques (Davis *et al.*, 2002). L'équipe de Per Kogner a par ailleurs montré que les

effets cytotoxiques du DHA sur les cellules de neuroblastome passaient par l'accumulation d'hydroperoxydes d'acides gras, correspondant en fait à un processus incomplet de métabolisation du DHA, n'aboutissant pas à la production de résolvines ou de protectines (Gleissman *et al.*, 2010b). Ainsi, l'étude des produits du métabolisme du DHA pourrait représenter une piste intéressante pour la compréhension des mécanismes d'action de cet acide gras.

Enfin, si l'effet du DHA 1 µM sur la densité de courant sodique mesuré (diminution d'environ 60%) est moins important que celui de la TTX à 30 µM (qui bloque la quasi-totalité du courant), l'effet sur l'invasivité des cellules est identique. Aunsi nous pourrions étudier l'effet du DHA sur le pH cellulaire (intracellulaire et périmembranaire) ainsi que sur l'activité du NHE1, dans les cellules MDA-MB-231. Nous saurons alors si l'effet du DHA sur l'invasion passe uniquement par la régulation du Na_V ou s'il peut également modifier directement l'activité des autres acteurs impliqués dans la régulation de l'invasivité des cellules cancéreuses.

Cette étude nous aura donc permis d'étudier la régulation par les AGPI n-3 de nouveaux mécanismes impliqués dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires. Le développement des modèles *in vivo* évoqués précédemment, pourrait alors permettre, en utilisant des protocoles de modification nutritionnelle (régimes pauvres ou riches en DHA) de valider le Na_V comme cible potentielle d'intervention nutritionnelle à visée thérapeutique.

Publications non intégrées à la thèse

Tran TA, Gillet L, Roger S, Besson P, White E, Le Guennec JY. 2009. Non-anti-mitotic concentrations of taxol reduce breast cancer cell invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(2):304-8.

Roger S, Gillet L, Baroja-Mazo A, Surprenant A, Pelegrin P. 2010. A C-terminal calmodulin binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J Biol Chem*. 285(23):17514-24.

Depla M, Uzbekov R, Hourioux C, Blanchard E, Le Gouge A, Gillet L, Roingeard P. 2010. Ultrastructural and quantitative analysis of the lipid droplet clustering induced by hepatitis C virus core protein. *Cell Mol Life Sci*. Sous presse.

Bibliographie

Ouvrages imprimés

ASHCROFT, F.M. *Ion Channels and Disease*. Academic Press, 2000, ISBN 0-12-065310-9.

HILLE, B. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2nd Ed, 1992.

MEDART, J. *Manuel pratique de nutrition*. De Boeck Université, 2009, ISBN 978-2-8041-0230-2.

Chapitre dans un ouvrage imprimé

FERLAY, J., HERY, C., AUTIER, P., SANKARANARAYANAN, R. Global Burden of Breast Cancer. In : LI, C. I. (éd), *Breast Cancer Epidemiology*. Springer New York, 2010, ISBN 978-1-4419-0684-7.

WOOLEY, D.E. The Neurotoxicology of DDT and possible mechanism of Action. In *Mechanisms of Neurotoxic Substances* ; Prasad, K. N., Vernadakis, A., Eds.; Raven Press : New York, 1981; pp 95-141.

Travaux universitaires

BRISSON, L. *Rôle du pH intracellulaire et de sa régulation dans la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires*. Mémoire de Master 2, Université François-Rabelais de Tours, 2009.

DRIFFORT, V. *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 2, Université François-Rabelais de Tours, 2010.

ROGER, S. *Intervention des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité de cellules tumorales*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2005.

Articles de périodiques imprimés

RIBOLI, E. Cancers, environnements et modes de vie. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 2004, 11, 3, 157-66.

Sites web consultés

http://acces.inrp.fr/acces/equipes/santeepi/travaux/cancersein/glandemammaire/ ; Consulté le 3 mai 2010

http://www.adiagene.fr ; Consulté le 19 avril 2010

http://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN1images.php ; Consulté le 3 mai 2010

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=neurosci&part=A228&rendertype=box&id=A229 ; Consulté le 22 avril 2010

http://www.iuphar-db.org/PRODDATABASE/FamilyMenuForward?familyId=82 ; Consulté le 24 avril 2010

Publications internationales

Abi-Char, J., Maguy, A., Coulombe, A., Balse, E., Ratajczak, P., Samuel, J.L., Nattel, S., and Hatem, S.N. (2007) Membrane cholesterol modulates Kv1.5 potassium channel distribution and function in rat cardiomyocytes. *J Physiol* **582**: 1205-1217.

Abriel, H., Kamynina, E., Horisberger, J.D., and Staub, O. (2000) Regulation of the cardiac voltage-gated Na+ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett* **466**: 377-380.

Abriel, H., and Staub, O. (2005) Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)* **20**: 398-407.

Abriel, H. (2010) Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 2-11.

Adam, K.R., and Weiss, C. (1959) Actions of scorpion venom on skeletal muscle. *Br J Pharmacol Chemother* **14**: 334-339.

Adelman, J.P. (1995) Proteins that interact with the pore-forming subunits of voltage-gated ion channels. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 286-295.

Ahmmed, G.U., Xu, Y., Hong Dong, P., Zhang, Z., Eiserich, J., and Chiamvimonvat, N. (2001) Nitric oxide modulates cardiac Na(+) channel via protein kinase A and protein kinase G. *Circ Res* **89**: 1005-1013.

Albrieux, M., Platel, J.C., Dupuis, A., Villaz, M., and Moody, W.J. (2004) Early expression of sodium channel transcripts and sodium current by cajal-retzius cells in the preplate of the embryonic mouse neocortex. *J Neurosci* **24**: 1719-1725.

Aley, K.O., Martin, A., McMahon, T., Mok, J., Levine, J.D., and Messing, R.O. (2001) Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* **21**: 6933-6939.

Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W.R., and Polyak, K. (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* **6**: 17-32.

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.

Aman, T.K., Grieco-Calub, T.M., Chen, C., Rusconi, R., Slat, E.A., Isom, L.L., and Raman, I.M. (2009) Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* **29**: 2027-2042.

Amaya, F., Decosterd, I., Samad, T.A., Plumpton, C., Tate, S., Mannion, R.J., Costigan, M., and Woolf, C.J. (2000) Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol Cell Neurosci* **15**: 331-342.

Andersen, O.S., Nielsen, C., Maer, A.M., Lundbaek, J.A., Goulian, M., and Koeppe, R.E., 2nd (1999) Ion channels as tools to monitor lipid bilayer-membrane protein interactions: gramicidin channels as molecular force transducers. *Methods Enzymol* **294**: 208-224.

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.

Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjakoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G., and Easton, D.F. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**: 1117-1130.

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.

Armstrong, B., and Doll, R. (1975) Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* **15**: 617-631.

Armstrong, C.M. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* **61**: 644-683.

Baden, D.G., Bikhazi, G., Decker, S.J., Foldes, F.F., and Leung, I. (1984) Neuromuscular blocking action of two brevetoxins from the Florida red tide organism Ptychodiscus brevis. *Toxicon* **22**: 75-84.

Bagga, D., Anders, K.H., Wang, H.J., and Glaspy, J.A. (2002) Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer* **42**: 180-185.

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.

Balijepalli, R.C., and Kamp, T.J. (2008) Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol* **98**: 149-160.

Barascu, A., Besson, P., Le Floch, O., Bougnoux, P., and Jourdan, M.L. (2006) CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 196-208.

Barrett, A.J. (1980) Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* **187**: 909-912.

Barrett, A.J., and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 535-561.

Begin, M.E., and Ells, G. (1987) Effects of C18 fatty acids on breast carcinoma cells in culture. *Anticancer Res* **7**: 215-217.

Begin, M.E. (1990) Fatty acids, lipid peroxidation and diseases. *Proc Nutr Soc* **49**: 261-267.

Bendahhou, S., Cummins, T.R., Potts, J.F., Tong, J., and Agnew, W.S. (1995) Serine-1321-independent regulation of the mu 1 adult skeletal muscle Na+ channel by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12003-12007.

Bennett, E., Urcan, M.S., Tinkle, S.S., Koszowski, A.G., and Levinson, S.R. (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J Gen Physiol* **109**: 327-343.

Bennett, V., and Baines, A.J. (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* **81**: 1353-1392.

Beress, L., Beress, R., and Wunderer, G. (1975) Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from Anemonia sulcata. *FEBS Lett* **50**: 311-314.

Besson, P., Gore, J., Vincent, E., Hoinard, C., and Bougnoux, P. (1996) Inhibition of Na+/H+ exchanger activity by an alkyl-lysophospholipid analogue in a human breast cancer cell line. *Biochem Pharmacol* **51**: 1153-1158.

Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**: 555-592.

Bezzina, C.R., Shimizu, W., Yang, P., Koopmann, T.T., Tanck, M.W., Miyamoto, Y., Kamakura, S., Roden, D.M., and Wilde, A.A. (2006) Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* **113**: 338-344.

Bidard, J.N., Vijverberg, H.P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R., and Lazdunski, M. (1984) Ciguatoxin is a novel type of Na+ channel toxin. *J Biol Chem* **259**: 8353-8357.

Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**: 46-54.

Black, J.A., and Waxman, S.G. (1996) Sodium channel expression: a dynamic process in neurons and non-neuronal cells. *Dev Neurosci* **18**: 139-152.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.

Bodding, M. (2007) TRP proteins and cancer. *Cell Signal* **19**: 617-624.

Bosmans, F., and Tytgat, J. (2007) Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* **49**: 142-158.

Bougnoux, P. (1999) n-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2**: 121-126.

Bougnoux, P., Giraudeau, B., and Couet, C. (2006) Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 416-421.

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.

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.

Boyd, C., and Naray-Fejes-Toth, A. (2007) Steroid-mediated regulation of the epithelial sodium channel subunits in mammary epithelial cells. *Endocrinology* **148**: 3958-3967.

Boyd, N.F., Martin, L.J., Noffel, M., Lockwood, G.A., and Trichler, D.L. (1993) A meta-analysis of studies of dietary fat and breast cancer risk. *Br J Cancer* **68**: 627-636.

Boyle, P., and Boffetta, P. (2009) Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* **11 Suppl 3**: S3.

Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2008) Voltage-gated Na+ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* **12**: 1191-1203.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., and Jordans, S. (2008) Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* **90**: 194-207.

Brown, D.A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* **21**: 430-439.

Buell, P. (1973) Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1479-1483.

Buhling, F., Gerber, A., Hackel, C., Kruger, S., Kohnlein, T., Bromme, D., Reinhold, D., Ansorge, S., and Welte, T. (1999) Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**: 612-619.

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.

Calabresi, P., Misgeld, U., and Dodt, H.U. (1987) Intrinsic membrane properties of neostriatal neurons can account for their low level of spontaneous activity. *Neuroscience* **20**: 293-303.

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.

Cantrell, A.R., Ma, J.Y., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* **16**: 1019-1026.

Cantrell, A.R., Smith, R.D., Goldin, A.L., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1997) Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci* **17**: 7330-7338.

Cantrell, A.R., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1999a) Voltage-dependent neuromodulation of Na+ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**: 5301-5310.

Cantrell, A.R., Tibbs, V.C., Westenbroek, R.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1999b) Dopaminergic modulation of voltage-gated Na+ current in rat hippocampal neurons requires anchoring of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* **19**: RC21.

Cantrell, A.R., and Catterall, W.A. (2001) Neuromodulation of Na+ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci* **2**: 397-407.

Cantrell, A.R., Tibbs, V.C., Yu, F.H., Murphy, B.J., Sharp, E.M., Qu, Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (2002) Molecular mechanism of convergent regulation of brain Na(+) channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15. *Mol Cell Neurosci* **21**: 63-80.

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**: 786-795.

Casini, S., Verkerk, A.O., van Borren, M.M., van Ginneken, A.C., Veldkamp, M.W., de Bakker, J.M., and Tan, H.L. (2009) Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **81**: 72-81.

Catterall, W.A. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na+ ionophore. *J Biol Chem* **251**: 5528-5536.

Catterall, W.A. (1986a) Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends Neurosci* **9**: 7-10.

Catterall, W.A. (1986b) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* **55**: 953-985.

Catterall, W.A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**: 50-61.

Catterall, W.A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* **72**: S15-48.
Catterall, W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**: 13-25.
Catterall, W.A. (2001) A 3D view of sodium channels. *Nature* **409**: 988-989, 991.
Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**: 397-409.
Catterall, W.A., and Yarov-Yarovoy, V. (2010) Helical motion of an S4 voltage sensor revealed by gating pore currents. *Channels (Austin)* **4**.
Caygill, C.P., Charlett, A., and Hill, M.J. (1996) Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer* **74**: 159-164.
Cestele, S., and Catterall, W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **82**: 883-892.
Chahine, M., Ziane, R., Vijayaragavan, K., and Okamura, Y. (2005) Regulation of Na v channels in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 496-502.
Chajes, V., Sattler, W., Stranzl, A., and Kostner, G.M. (1995) Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides and vitamin-E. *Breast Cancer Res Treat* **34**: 199-212.
Chajes, V., Lavillonniere, F., Maillard, V., Giraudeau, B., Jourdan, M.L., Sebedio, J.L., and Bougnoux, P. (2003) Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutr Cancer* **45**: 17-23.
Chajes, V., Thiebaut, A.C., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M.C., Joulin, V., Lenoir, G.M., and Clavel-Chapelon, F. (2008) Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol* **167**: 1312-1320.
Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-572.
Chandy, K.G., DeCoursey, T.E., Cahalan, M.D., and Gupta, S. (1985) Ion channels in lymphocytes. *J Clin Immunol* **5**: 1-6.
Chen, C., and Cannon, S.C. (1995) Modulation of Na+ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflugers Arch* **431**: 186-195.
Chen, C., Westenbroek, R.E., Xu, X., Edwards, C.A., Sorenson, D.R., Chen, Y., McEwen, D.P., O'Malley, H.A., Bharucha, V., Meadows, L.S., Knudsen, G.A., Vilaythong, A., Noebels, J.L., Saunders, T.L., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W.A., and Isom, L.L. (2004) Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* **24**: 4030-4042.
Ch'en, F.F., Dilworth, E., Swietach, P., Goddard, R.S., and Vaughan-Jones, R.D. (2003) Temperature dependence of Na+-H+ exchange, Na+-HCO3- co-transport, intracellular buffering and intracellular pH in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* **552**: 715-726.
Chen, T.C., Law, B., Kondratyuk, T., and Rossie, S. (1995) Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J Biol Chem* **270**: 7750-7756.
Chen, Y., Cantrell, A.R., Messing, R.O., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2005) Specific modulation of Na+ channels in hippocampal neurons by protein kinase C epsilon. *J Neurosci* **25**: 507-513.

Chen, Y., Yu, F.H., Sharp, E.M., Beacham, D., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2008) Functional properties and differential neuromodulation of Na(v)1.6 channels. *Mol Cell Neurosci* **38**: 607-615.

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.

Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and 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.

Chiche, J., Ilc, K., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2010) Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration. *Adv Enzyme Regul* **50**: 20-33.

Chin, D., and Means, A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* **10**: 322-328.

Chin, L.S., Park, C.C., Zitnay, K.M., Sinha, M., DiPatri, A.J., Jr., Perillan, P., and Simard, J.M. (1997) 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K+ channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res* **48**: 122-127.

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.

Chopra, S.S., Stroud, D.M., Watanabe, H., Bennett, J.S., Burns, C.G., Wells, K.S., Yang, T., Zhong, T.P., and Roden, D.M. (2010) Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ Res* **106**: 1342-1350.

Clavel-Chapelon, F. (2002) Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. *Br J Cancer* **86**: 723-727.

Cognault, S., Jourdan, M.L., Germain, E., Pitavy, R., Morel, E., Durand, G., Bougnoux, P., and Lhuillery, C. (2000) Effect of an alpha-linolenic acid-rich diet on rat mammary tumor growth depends on the dietary oxidative status. *Nutr Cancer* **36**: 33-41.

Cohen, L.A., Chen-Backlund, J.Y., Sepkovic, D.W., and Sugie, S. (1993) Effect of varying proportions of dietary menhaden and corn oil on experimental rat mammary tumor promotion. *Lipids* **28**: 449-456.

Coleman, M.P., Gatta, G., Verdecchia, A., Esteve, J., Sant, M., Storm, H., Allemani, C., Ciccolallo, L., Santaquilani, M., and Berrino, F. (2003) EUROCARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol* **14 Suppl 5**: v128-149.

Colquhoun, A., and Schumacher, R.I. (2001) gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species

generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1533**: 207-219.

Costa, M.R., Casnellie, J.E., and Catterall, W.A. (1982) Selective phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **257**: 7918-7921.

Costa, M.R., and Catterall, W.A. (1984) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel in synaptic nerve ending particles. *J Biol Chem* **259**: 8210-8218.

Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387-2392.

Cronin, N.B., O'Reilly, A., Duclohier, H., and Wallace, B.A. (2005) Effects of deglycosylation of sodium channels on their structure and function. *Biochemistry* **44**: 441-449.

Cruz, L.J., Gray, W.R., Olivera, B.M., Zeikus, R.D., Kerr, L., Yoshikami, D., and Moczydlowski, E. (1985) Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* **260**: 9280-9288.

Dascal, N., and Lotan, I. (1991) Activation of protein kinase C alters voltage dependence of a Na+ channel. *Neuron* **6**: 165-175.

Davis, M.J., Wu, X., Nurkiewicz, T.R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M.A., and Wilson, E. (2002) Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem Biophys* **36**: 41-66.

Debies, M.T., and Welch, D.R. (2001) Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**: 441-451.

DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., and Cahalan, M.D. (1984) Voltage-gated K+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**: 465-468.

Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., D'Alessio, S., Del Rosso, A., Magnelli, L., and Chiarugi, V. (2002) Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* **19**: 193-207.

Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., and Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L429-438.

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.

Deutsch, C., and Lee, S.C. (1988) Cell volume regulation in lymphocytes. *Ren Physiol Biochem* **11**: 260-276.

Diggle, C.P. (2002) In vitro studies on the relationship between polyunsaturated fatty acids and cancer: tumour or tissue specific effects? *Prog Lipid Res* **41**: 240-253.

Ding, Y., and Djamgoz, M.B. (2004) Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na+ current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 1249-1260.

Ding, Y., Brackenbury, W.J., Onganer, P.U., Montano, X., Porter, L.M., Bates, L.F., and Djamgoz, M.B. (2008) Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na+ channel activity. *J Cell Physiol* **215**: 77-81.

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.

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.

Doll, R. (1992) The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* **52**: 2024s-2029s.

Dominguez, J.N., Navarro, F., Franco, D., Thompson, R.P., and Aranega, A.E. (2005) Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovasc Res* **65**: 842-850.

Dona, M., Fredman, G., Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Goodarzi, A., Cheng, G., von Andrian, U.H., and Serhan, C.N. (2008) Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood* **112**: 848-855.

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.

Dubois, J.M., and Rouzaire-Dubois, B. (1993) Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Mol Biol* **59**: 1-21.

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.

Duffy, M.J., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E., and O'Higgins, N. (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* **2**: 252-257.

Eccles, S.A. (2001) The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**: 393-406.

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

Elinder, F., Nilsson, J., and Arhem, P. (2007) On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* **92**: 1-7.

England, S., Bevan, S., and Docherty, R.J. (1996) PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol* **495 (Pt 2)**: 429-440.

Esteve, J. (2007) [Incidence of breast cancer in France and other industrialized countries]. *Presse Med* **36**: 315-321.

Evan, G.I., and Vousden, K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-348.

Fainzilber, M., Kofman, O., Zlotkin, E., and Gordon, D. (1994) A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. *J Biol Chem* **269**: 2574-2580.

Farber, E. (1984) The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* **44**: 4217-4223.

Favero, A., Parpinel, M., and Franceschi, S. (1998) Diet and risk of breast cancer: major findings from an Italian case-control study. *Biomed Pharmacother* **52**: 109-115.

Fay, M.P., and Freedman, L.S. (1997) Meta-analyses of dietary fats and mammary neoplasms in rodent experiments. *Breast Cancer Res Treat* **46**: 215-223.

Fidler, I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.

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.

Fitzgerald, E.M., Okuse, K., Wood, J.N., Dolphin, A.C., and Moss, S.J. (1999) cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol* **516 (Pt 2)**: 433-446.

Flourakis, M., and Prevarskaya, N. (2009) Insights into Ca2+ homeostasis of advanced prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1105-1109.

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.

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., 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.

Fraser, S.P., Ozerlat-Gunduz, I., Onkal, R., Diss, J.K., Latchman, D.S., and Djamgoz, M.B. (2010) Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Role in adhesion. *J Cell Physiol*.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362-374.

Frohnwieser, B., Chen, L.Q., Schreibmayer, W., and Kallen, R.G. (1997) Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* **498 (Pt 2)**: 309-318.

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., Gawlinski, E.T., Gmitro, A.F., Kaylor, B., and Gillies, R.J. (2006) Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* **66**: 5216-5223.

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.

Gellens, M.E., George, A.L., Jr., Chen, L.Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R.L., and Kallen, R.G. (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 554-558.

George, A.L., Jr., Knittle, T.J., and Tamkun, M.M. (1992) Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4893-4897.

Gerber, B., Muller, H., Reimer, T., Krause, A., and Friese, K. (2003) Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **79**: 265-276.

Gershon, E., Weigl, L., Lotan, I., Schreibmayer, W., and Dascal, N. (1992) Protein kinase A reduces voltage-dependent Na+ current in Xenopus oocytes. *J Neurosci* **12**: 3743-3752.

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.

Gillet, L., Roger, S., Bougnoux, P., Le Guennec, J.Y., and Besson, P. (2010) Beneficial effects of omega-3 long-chain fatty acids in breast cancer and cardiovascular diseases: voltage-gated sodium channels as a common feature? *Biochimie*.

Giorgione, J.R., Kraayenhof, R., and Epand, R.M. (1998) Interfacial membrane properties modulate protein kinase C activation: role of the position of acyl chain unsaturation. *Biochemistry* **37**: 10956-10960.

Gleissman, H., Johnsen, J.I., and Kogner, P. (2010a) Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? *Exp Cell Res* **316**: 1365-1373.

Gleissman, H., Yang, R., Martinod, K., Lindskog, M., Serhan, C.N., Johnsen, J.I., and Kogner, P. (2010b) Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. *Faseb J* **24**: 906-915.

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.

Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* **20**: 543-556.

Goel, D.P., Maddaford, T.G., and Pierce, G.N. (2002) Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H1688-1694.

Gold, M.S., Reichling, D.B., Shuster, M.J., and Levine, J.D. (1996) Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na+ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1108-1112.

Gold, M.S., Levine, J.D., and Correa, A.M. (1998) Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* **18**: 10345-10355.

Goldin, A.L. (1993) Accessory subunits and sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* **3**: 272-277.

Goldin, A.L. (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **63**: 871-894.

Goldin, A.L. (2003) Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 284-290.

Gonoi, T., Ashida, K., Feller, D., Schmidt, J., Fujiwara, M., and Catterall, W.A. (1986) Mechanism of action of a polypeptide neurotoxin from the coral Goniopora on sodium channels in mouse neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* **29**: 347-354.

Gonoi, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Nakamura, H., and Catterall, W.A. (1987) Actions of a polypeptide toxin from the marine snail Conus striatus on voltage-sensitive sodium channels. *Mol Pharmacol* **32**: 691-698.

Gonzalez, M.J., Schemmel, R.A., Dugan, L., Jr., Gray, J.I., and Welsch, C.W. (1993) Dietary fish oil inhibits human breast carcinoma growth: a function of increased lipid peroxidation. *Lipids* **28**: 827-832.

Goodstine, S.L., Zheng, T., Holford, T.R., Ward, B.A., Carter, D., Owens, P.H., and Mayne, S.T. (2003) Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women. *J Nutr* **133**: 1409-1414.

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.

Grammatikos, S.I., Subbaiah, P.V., Victor, T.A., and Miller, W.M. (1994) n-3 and n-6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br J Cancer* **70**: 219-227.

Greenwald, P. (1999) Role of dietary fat in the causation of breast cancer: point. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 3-7.

Grieco, T.M., Malhotra, J.D., Chen, C., Isom, L.L., and Raman, I.M. (2005) Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. *Neuron* **45**: 233-244.

Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., and Djamgoz, M.B. (1995) Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* **369**: 290-294.

Grob, M., Drolet, G., and Mouginot, D. (2004) Specific Na+ sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* **24**: 3974-3984.

Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V., and Turk, D. (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *Embo J* **18**: 793-803.

Gupta, G.P., and Massague, J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**: 679-695.

Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. (1996) Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *J Biol Chem* **271**: 27975-27978.

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.

Haider, S., Tarasov, A.I., Craig, T.J., Sansom, M.S., and Ashcroft, F.M. (2007) Identification of the PIP2-binding site on Kir6.2 by molecular modelling and functional analysis. *Embo J* **26**: 3749-3759.

Hall, J.M., Friedman, L., Guenther, C., Lee, M.K., Weber, J.L., Black, D.M., and King, M.C. (1992) Closing in on a breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Genet* **50**: 1235-1242.

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.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Harmar, A.J., Hills, R.A., Rosser, E.M., Jones, M., Buneman, O.P., Dunbar, D.R., Greenhill, S.D., Hale, V.A., Sharman, J.L., Bonner, T.I., Catterall, W.A., Davenport, A.P., Delagrange, P., Dollery, C.T., Foord, S.M., Gutman, G.A., Laudet, V., Neubig, R.R., Ohlstein, E.H., Olsen, R.W., Peters, J., Pin, J.P., Ruffolo, R.R., Searls, D.B., Wright, M.W., and Spedding, M. (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res* **37**: D680-685.

Harris, C.C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* **51**: 5023s-5044s.

Harris, M.A., Hansen, R.A., Vidsudhiphan, P., Koslo, J.L., Thomas, J.B., Watkins, B.A., and Allen, K.G. (2001) Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **65**: 23-29.

Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., and Saito, T. (1999) PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu. *Biochim Biophys Acta* **1450**: 99-106.

Helms, J.B., and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **5**: 247-254.

Herfst, L.J., Rook, M.B., and Jongsma, H.J. (2004) Trafficking and functional expression of cardiac Na+ channels. *J Mol Cell Cardiol* **36**: 185-193.

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.

Hicke, L., and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 141-172.

Hilber, K., Sandtner, W., Kudlacek, O., Glaaser, I.W., Weisz, E., Kyle, J.W., French, R.J., Fozzard, H.A., Dudley, S.C., and Todt, H. (2001) The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation. *J Biol Chem* **276**: 27831-27839.

Hilborn, M.D., Vaillancourt, R.R., and Rane, S.G. (1998) Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the src signaling pathway. *J Neurosci* **18**: 590-600.

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.

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.

Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.L., and Serhan, C.N. (2003) Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* **278**: 14677-14687.

Horn, R., and Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**: 145-159.

Hrabec, E., Strek, M., Nowak, D., Greger, J., Suwalski, M., and Hrabec, Z. (2002) Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**: 197-204.

Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**: 703-707.

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.

Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H.O., Beeson, L., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Fraser, G.E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Howe, G.R., and et al. (1996) Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med* **334**: 356-361.

Hursting, S.D., Thornquist, M., and Henderson, M.M. (1990) Types of dietary fat and the incidence of cancer at five sites. *Prev Med* **19**: 242-253.

Hursting, S.D., Slaga, T.J., Fischer, S.M., DiGiovanni, J., and Phang, J.M. (1999) Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. *J Natl Cancer Inst* **91**: 215-225.

Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2001) Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**: 141-150.

Isbilen, B., Fraser, S.P., and Djamgoz, M.B. (2006) Docosahexaenoic acid (omega-3) blocks voltage-gated sodium channel activity and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 2173-2182.

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., De Jongh, K.S., and Catterall, W.A. (1994) Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* **12**: 1183-1194.

Isom, L.L., Scheuer, T., Brownstein, A.B., Ragsdale, D.S., Murphy, B.J., and Catterall, W.A. (1995) 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.

Isom, L.L. (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* **7**: 42-54.

Isom, L.L. (2002) The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci* **7**: 12-23.

Itoh, K., Stevens, B., Schachner, M., and Fields, R.D. (1995) Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* **270**: 1369-1372.

Jakobisiak, M., Lasek, W., and Golab, J. (2003) Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* **90**: 103-122.

Jedeszko, C., and Sloane, B.F. (2004) Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**: 1017-1027.

Jiang, W.G., Bryce, R.P., and Mansel, R.E. (1997) Gamma linolenic acid regulates gap junction communication in endothelial cells and their interaction with tumour cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**: 307-316.

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.

Jo, T., Iida, H., Kishida, S., Imuta, H., Oonuma, H., Nagata, T., Hara, H., Iwasawa, K., Soma, M., Sato, Y., Nagase, T., Nagai, R., and Nakajima, T. (2005) Acute and chronic effects of eicosapentaenoic acid on voltage-gated sodium channel expressed in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1452-1459.

Johannessen, M., Ramachandran, S., Riemer, L., Ramos-Serrano, A., Ruoho, A.E., and Jackson, M.B. (2009) Voltage-gated sodium channel modulation by sigma-receptors in cardiac myocytes and heterologous systems. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C1049-1057.

Johnson, D., and Bennett, E.S. (2006) Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating. *J Biol Chem* **281**: 25875-25881.

Jover, E., Couraud, F., and Rochat, H. (1980) Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 1607-1614.

Joyce, J.A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F.Y., Greenbaum, D.C., Hager, J.H., Bogyo, M., and Hanahan, D. (2004) Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**: 443-453.

Joyce, J.A., and Hanahan, D. (2004) Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* **3**: 1516-1619.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239-252.

Jude, S., Bedut, S., Roger, S., Pinault, M., Champeroux, P., White, E., and Le Guennec, J.Y. (2003) Peroxidation of docosahexaenoic acid is responsible for its effects on I TO and I SS in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **139**: 816-822.

Jude, S., Roger, S., Martel, E., Besson, P., Richard, S., Bougnoux, P., Champeroux, P., and Le Guennec, J.Y. (2006) 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* **90**: 299-325.

Jude, S., Martel, E., Vincent, F., Besson, P., Couet, C., Ogilvie, G.K., Pinault, M., De Chalendar, C., Bougnoux, P., Richard, S., Champeroux, P., Crozatier, B., and Le Guennec, J.Y. (2007) Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* **98**: 1143-1151.

Kaizer, L., Boyd, N.F., Kriukov, V., and Tritchler, D. (1989) Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study. *Nutr Cancer* **12**: 61-68.

Kang, J.X., and Leaf, A. (1996) Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na+ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3542-3546.

Kang, J.X., Li, Y., and Leaf, A. (1997) Regulation of sodium channel gene expression by class I antiarrhythmic drugs and n - 3 polyunsaturated fatty acids in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2724-2728.

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.

Kao, C.Y., and Fuhrman, F.A. (1963) Pharmacological studies on tarichatoxin, a potent neurotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* **140**: 31-40.

Kao, C.Y., and Nishiyama, A. (1965) Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. *J Physiol* **180**: 50-66.

Kapoor, N., Bartoszewski, R., Qadri, Y.J., Bebok, Z., Bubien, J.K., Fuller, C.M., and Benos, D.J. (2009) Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. *J Biol Chem* **284**: 24526-24541.

Kass, R.S. (2006) Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17 Suppl 1**: S21-S25.

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.

Kato, Y., Ozawa, S., Tsukuda, M., Kubota, E., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., and Hata, R. (2007) Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *Febs J* **274**: 3171-3183.

Kazen-Gillespie, K.A., Ragsdale, D.S., D'Andrea, M.R., Mattei, L.N., Rogers, K.E., and Isom, L.L. (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J Biol Chem* **275**: 1079-1088.

Kellenberger, S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996) Movement of the Na+ channel inactivation gate during inactivation. *J Biol Chem* **271**: 30971-30979.

Kellenberger, S., West, J.W., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (1997a) Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na+ channels. *J Gen Physiol* **109**: 607-617.

Kellenberger, S., West, J.W., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1997b) Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na+ channels. *J Gen Physiol* **109**: 589-605.

Key, J., Hodgson, S., Omar, R.Z., Jensen, T.K., Thompson, S.G., Boobis, A.R., Davies, D.S., and Elliott, P. (2006) Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* **17**: 759-770.

Key, T.J., Allen, N.E., Spencer, E.A., and Travis, R.C. (2002) The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* **360**: 861-868.

Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M., Woolf, C.J., and Kovacs, D.M. (2007) BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* **9**: 755-764.

Kim, W., McMurray, D.N., and Chapkin, R.S. (2010) n-3 polyunsaturated fatty acids--physiological relevance of dose. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**: 155-158.

Kindzelskii, A.L., Amhad, I., Keller, D., Zhou, M.J., Haugland, R.P., Garni-Wagner, B.A., Gyetko, M.R., Todd, R.F., 3rd, and 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.

Kinoshita, K., Noguchi, M., Earashi, M., Tanaka, M., and Sasaki, T. (1994) Inhibitory effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on growth and metastasis of murine transplantable mammary tumor. *In Vivo* **8**: 371-374.

Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., and Rinne, A. (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* **264**: 467-473.

Klemencic, I., Carmona, A.K., Cezari, M.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Guncar, G., Turk, D., Krizaj, I., Turk, V., and Turk, B. (2000) Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* **267**: 5404-5412.

Koblinski, J.E., Ahram, M., and Sloane, B.F. (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* **291**: 113-135.

Kunzelmann, K. (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**: 159-173.

Kuo, C.C. (1998) A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na+ channels. *Mol Pharmacol* **54**: 712-721.

Lahn, M., Kohler, G., Sundell, K., Su, C., Li, S., Paterson, B.M., and Bumol, T.F. (2004) Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer. *Oncology* **67**: 1-10.

Lands, W.E., Hamazaki, T., Yamazaki, K., Okuyama, H., Sakai, K., Goto, Y., and Hubbard, V.S. (1990) Changing dietary patterns. *Am J Clin Nutr* **51**: 991-993.

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.

Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., and Wolk, A. (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* **79**: 935-945.

Laufs, S., Schumacher, J., and Allgayer, H. (2006) Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* **5**: 1760-1771.

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.

Leaf, A., Xiao, Y.F., and Kang, J.X. (2002) Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **67**: 113-120.

Lecaille, F., Bromme, D., and Lalmanach, G. (2008) Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* **90**: 208-226.

Leifert, W.R., McMurchie, E.J., and Saint, D.A. (1999) Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* **520 Pt 3**: 671-679.

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, M., West, J.W., Lai, Y., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1992) Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* **8**: 1151-1159.

Li, M., West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1993) Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **261**: 1439-1442.

Li, Q., Tan, L., Wang, C., Li, N., Li, Y., Xu, G., and Li, J. (2006) Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur J Nutr* **45**: 144-151.

Li, R.A., and Tomaselli, G.F. (2004) Using the deadly mu-conotoxins as probes of voltage-gated sodium channels. *Toxicon* **44**: 117-122.

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.

Liotta, L.A., and Kohn, E.C. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**: 375-379.

Lipkind, G.M., and Fozzard, H.A. (2000) KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. *Biochemistry* **39**: 8161-8170.

Lippman, S.M., and Hong, W.K. (2002) Cancer prevention by delay. Commentary re: J. A. O'Shaughnessy et al., Treatment and Prevention of Intraepithelial Neoplasia: An Important Target for Accelerated New Agent Development. Clin. Cancer Res., 8: 314-346, 2002. *Clin Cancer Res* **8**: 305-313.

Little, M.J., Wilson, H., Zappia, C., Cestele, S., Tyler, M.I., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon, D., and Nicholson, G.M. (1998) Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett* **439**: 246-252.

Liu, C., Dib-Hajj, S.D., and Waxman, S.G. (2001) Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNav1.9a (NaN). *J Biol Chem* **276**: 18925-18933.

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, S.J., and Kennedy, R.H. (1998) alpha1-Adrenergic activation of L-type Ca current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am J Physiol* **274**: H2203-2207.

Liu, Y., Jurman, M.E., and Yellen, G. (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K+ channel during gating. *Neuron* **16**: 859-867.

Lombet, A., Mourre, C., and Lazdunski, M. (1988) Interaction of insecticides of the pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res* **459**: 44-53.

Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**: 903-908.

Lopez-Santiago, L.F., Pertin, M., Morisod, X., Chen, C., Hong, S., Wiley, J., Decosterd, I., and Isom, L.L. (2006) Sodium channel beta2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain. *J Neurosci* **26**: 7984-7994.

Lowe, J.S., Palygin, O., Bhasin, N., Hund, T.J., Boyden, P.A., Shibata, E., Anderson, M.E., and Mohler, P.J. (2008) Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol* **180**: 173-186.

Lu, T., Lee, H.C., Kabat, J.A., and Shibata, E.F. (1999) Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein alpha subunit. *J Physiol* **518 (Pt 2)**: 371-384.

Lundbaek, J.A., Birn, P., Hansen, A.J., Sogaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., Bruno, M.J., Tape, S.E., Egebjerg, J., Greathouse, D.V., Mattice, G.L., Koeppe, R.E., 2nd, and Andersen, O.S. (2004) Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J Gen Physiol* **123**: 599-621.

Lynch, H.T., Watson, P., Conway, T., Fitzsimmons, M.L., and Lynch, J. (1988) Breast cancer family history as a risk factor for early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **11**: 263-267.

Ma, D.W., Seo, J., Switzer, K.C., Fan, Y.Y., McMurray, D.N., Lupton, J.R., and Chapkin, R.S. (2004) n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem* **15**: 700-706.

Mackay, H.J., and Twelves, C.J. (2003) Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocr Relat Cancer* **10**: 389-396.

Madani, S., Hichami, A., Legrand, A., Belleville, J., and Khan, N.A. (2001) Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *Faseb J* **15**: 2595-2601.

Madshus, I.H. (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* **250**: 1-8.

Maguy, A., Hebert, T.E., and Nattel, S. (2006) Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* **69**: 798-807.

Maillard, V., Bougnoux, P., Ferrari, P., Jourdan, M.L., Pinault, M., Lavillonniere, F., Body, G., Le Floch, O., and Chajes, V. (2002) N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *Int J Cancer* **98**: 78-83.

Malhotra, J.D., Koopmann, M.C., Kazen-Gillespie, K.A., Fettman, N., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2002) Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *J Biol Chem* **277**: 26681-26688.

Mareel, M., and Leroy, A. (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* **83**: 337-376.

Martinez-Zaguilan, R., Raghunand, N., Lynch, R.M., Bellamy, W., Martinez, G.M., Rojas, B., Smith, D., Dalton, W.S., and Gillies, R.J. (1999) pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H+-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* **57**: 1037-1046.

Matsuda, J.J., Lee, H., and Shibata, E.F. (1992) Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **70**: 199-207.

Maurice, N., Tkatch, T., Meisler, M., Sprunger, L.K., and Surmeier, D.J. (2001) D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and

persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* **21**: 2268-2277.

McCormick, K.A., Srinivasan, J., White, K., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1999) The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem* **274**: 32638-32646.

McEwen, D.P., Meadows, L.S., Chen, C., Thyagarajan, V., and Isom, L.L. (2004) Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem* **279**: 16044-16049.

McGrath, M.E. (1999) The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 181-204.

McPhee, J.C., Ragsdale, D.S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem* **270**: 12025-12034.

McPherson, K., Steel, C.M., and Dixon, J.M. (2000) ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj* **321**: 624-628.

Meadows, L., Malhotra, J.D., Stetzer, A., Isom, L.L., and Ragsdale, D.S. (2001) The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *J Neurochem* **76**: 1871-1878.

Meadows, L.S., Chen, Y.H., Powell, A.J., Clare, J.J., and Ragsdale, D.S. (2002) Functional modulation of human brain Nav1.3 sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary beta 1, beta 2 and beta 3 subunits. *Neuroscience* **114**: 745-753.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D.J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M.T., Makielski, J.C., and Ackerman, M.J. (2007) SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**: 134-142.

Meyer, A., Cirpus, P., Ott, C., Schlecker, R., Zahringer, U., and Heinz, E. (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in Euglena gracilis: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Delta4-fatty acyl group desaturase. *Biochemistry* **42**: 9779-9788.

Mies, F., Shlyonsky, V., Goolaerts, A., and Sariban-Sohraby, S. (2004) Modulation of epithelial Na+ channel activity by long-chain n-3 fatty acids. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F850-855.

Mies, F., Spriet, C., Heliot, L., and Sariban-Sohraby, S. (2007) Epithelial Na+ channel stimulation by n-3 fatty acids requires proximity to a membrane-bound A-kinase-anchoring protein complexed with protein kinase A and phosphodiesterase. *J Biol Chem* **282**: 18339-18347.

Mittmann, T., and Alzheimer, C. (1998) Muscarinic inhibition of persistent Na+ current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **79**: 1579-1582.

Miyamoto, K., Nakagawa, T., and Kuroda, Y. (2001) Solution structures of the cytoplasmic linkers between segments S4 and S5 (S4-S5) in domains III and IV of human brain sodium channels in SDS micelles. *J Pept Res* **58**: 193-203.

Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764-775.

Mohler, P.J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S.G., and Bennett, V. (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17533-17538.

Monk, M., and Holding, C. (2001) Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* **20**: 8085-8091.

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.

Moore, N.G., Wang-Johanning, F., Chang, P.L., and Johanning, G.L. (2001) Omega-3 fatty acids decrease protein kinase expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **67**: 279-283.

Moraes, L.A., Piqueras, L., and Bishop-Bailey, D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* **110**: 371-385.

Moran, O., Conti, F., and Tammaro, P. (2003) Sodium channel heterologous expression in mammalian cells and the role of the endogenous beta1-subunits. *Neurosci Lett* **336**: 175-179.

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.

Morrison, D.K. (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* **19**: 16-23.

Mort, J.S., Magny, M.C., and Lee, E.R. (1998) Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neoepitope. *Biochem J* **335 (Pt 3)**: 491-494.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.

Motoike, H.K., Liu, H., Glaaser, I.W., Yang, A.S., Tateyama, M., and Kass, R.S. (2004) The Na+ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* **123**: 155-165.

Muir, C.S. (1996) Epidemiology of cancer in ethnic groups. *Br J Cancer Suppl* **29**: S12-16.

Murphy, B.J., Rossie, S., De Jongh, K.S., and Catterall, W.A. (1993) Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na+ channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* **268**: 27355-27362.

Murray, K.T., Hu, N.N., Daw, J.R., Shin, H.G., Watson, M.T., Mashburn, A.B., and George, A.L., Jr. (1997) Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na+ channel. *Circ Res* **80**: 370-376.

Mycielska, M.E., and Djamgoz, M.B. (2004) Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci* **117**: 1631-1639.

Narahashi, T., Moore, J.W., and Scott, W.R. (1964) Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *J Gen Physiol* **47**: 965-974.

Narahashi, T., and Seyama, I. (1974) Mechanism of nerve membrane depolarization caused by grayanotoxin I. *J Physiol* **242**: 471-487.

Neher, E., and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802.

Newton, A.C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**: 2353-2364.

Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., and Droogmans, G. (1996) Volume-activated Cl- channels. *Gen Pharmacol* **27**: 1131-1140.

Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Hashimoto, E., Inoue, M., Yamamoto, M., Criss, W.E., and Kuroda, Y. (1978) A role of calcium in the activation of a new protein kinase system. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**: 209-220.

Nkondjock, A., and Ghadirian, P. (2005) [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Med Sci (Paris)* **21**: 175-180.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., and et al. (1984) Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127.

Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and Stuhmer, W. (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* **259**: 213-216.

Numann, R., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (1991) Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* **254**: 115-118.

Onkal, R., and Djamgoz, M.B. (2009) Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *Eur J Pharmacol* **625**: 206-219.

Ono, K., Kiyosue, T., and Arita, M. (1989) Isoproterenol, DBcAMP, and forskolin inhibit cardiac sodium current. *Am J Physiol* **256**: C1131-1137.

Ostrom, R.S., and Liu, X. (2007) Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods Mol Biol* **400**: 459-468.

Ottea, J.A., Payne, G.T., Bloomquist, J.R., and Soderlund, D.M. (1989) Activation of sodium channels and inhibition of [3H]batrachotoxinin A-20-alpha-benzoate binding by an N-alkylamide neurotoxin. *Mol Pharmacol* **36**: 280-284.

Ottman, R., Pike, M.C., King, M.C., and Henderson, B.E. (1983) Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* **2**: 556-558.

Ouadid-Ahidouch, H., and Ahidouch, A. (2008) K+ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* **221**: 1-6.

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.

Pala, V., Krogh, V., Muti, P., Chajes, V., Riboli, E., Micheli, A., Saadatian, M., Sieri, S., and Berrino, F. (2001) Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. *J Natl Cancer Inst* **93**: 1088-1095.

Palakurthi, S.S., Fluckiger, R., Aktas, H., Changolkar, A.K., Shahsafaei, A., Harneit, S., Kilic, E., and Halperin, J.A. (2000) Inhibition of translation initiation mediates the anticancer effect of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. *Cancer Res* **60**: 2919-2925.

Palermo, C., and Joyce, J.A. (2008) Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 22-28.

Palmer, C.P., Mahen, R., Schnell, E., Djamgoz, M.B., and Aydar, E. (2007) Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines. *Cancer Res* **67**: 11166-11175.

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.

Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **4**: 448-456.

Pardo, L.A., and Stuhmer, W. (2008) Eag1: an emerging oncological target. *Cancer Res* **68**: 1611-1613.

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

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.

Parton, R.G. (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* **42**: 155-166.

Parton, R.G., and Richards, A.A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**: 724-738.

Philippe, J.M., Dubois, J.M., Rouzaire-Dubois, B., Cartron, P.F., Vallette, F., and Morel, N. (2002) Functional expression of V-ATPases in the plasma membrane of glial cells. *Glia* **37**: 365-373.

Pitt, G.S. (2007) Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc Res* **73**: 641-647.

Popa, M.O., Alekov, A.K., Bail, S., Lehmann-Horn, F., and Lerche, H. (2004) Cooperative effect of S4-S5 loops in domains D3 and D4 on fast inactivation of the Na+ channel. *J Physiol* **561**: 39-51.

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., Zhang, L., and Barritt, G. (2007) TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 937-946.

Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2010) Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* **16**: 107-121.

Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V., and Weiss, S.J. (2000) Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* **192**: 789-799.

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.

Qu, Y., Curtis, R., Lawson, D., Gilbride, K., Ge, P., DiStefano, P.S., Silos-Santiago, I., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (2001) Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci* **18**: 570-580.

Rae, J., Cooper, K., Gates, P., and Watsky, M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* **37**: 15-26.

Rahamimoff, R., Butkevich, A., Duridanova, D., Ahdut, R., Harari, E., and Kachalsky, S.G. (1999) Multitude of ion channels in the regulation of transmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**: 281-288.

Rajendran, L., and Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**: 1099-1102.

Rao, G.N., Ney, E., and Herbert, R.A. (2000) Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Res Treat* **64**: 287-296.

Ratcliffe, C.F., Qu, Y., McCormick, K.A., Tibbs, V.C., Dixon, J.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2000) A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nat Neurosci* **3**: 437-444.

Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A.M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P.M., Guizard, A.V., Troussard, X., Bercelli, P., Colonna, M., Halna, J.M., Hedelin, G., Mace-Lesec'h, J., Peng, J., Buemi, A., Velten, M., Jougla, E., Arveux, P., Le Bodic, L., Michel, E., Sauvage, M., Schvartz, C., and Faivre, J. (2003) Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* **51**: 3-30.

Renaudo, A., Watry, V., Chassot, A.A., Ponzio, G., Ehrenfeld, J., and Soriani, O. (2004) Inhibition of tumor cell proliferation by sigma ligands is associated with K+ Channel inhibition and p27kip1 accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 1105-1114.

Renaudo, A., L'Hoste, S., Guizouarn, H., Borgese, F., and Soriani, O. (2007) Cancer cell cycle modulated by a functional coupling between sigma-1 receptors and Cl- channels. *J Biol Chem* **282**: 2259-2267.

Rink, T.J., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (1982) Cytoplasmic pH and free Mg2+ in lymphocytes. *J Cell Biol* **95**: 189-196.

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., Besson, P., and Le Guennec, J.Y. (2004) 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* **33**: 274-279.

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.

Rose, D.P. (1986) Dietary factors and breast cancer. *Cancer Surv* **5**: 671-687.

Rose, D.P., and Connolly, J.M. (1990) Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* **50**: 7139-7144.

Rose, D.P., Rayburn, J., Hatala, M.A., and Connolly, J.M. (1994) Effects of dietary fish oil on fatty acids and eicosanoids in metastasizing human breast cancer cells. *Nutr Cancer* **22**: 131-141.

Rose, D.P., Connolly, J.M., and Coleman, M. (1996) Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. *Clin Cancer Res* **2**: 1751-1756.

Rose, D.P., and Connolly, J.M. (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* **83**: 217-244.

Rotin, D., Staub, O., and Haguenauer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**: 1-17.

Rotin, D., and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 398-409.

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.

Ryu, J., Kim, H., Chang, E.J., Kim, H.J., Lee, Y., and Kim, H.H. (2010) Proteomic analysis of osteoclast lipid rafts: the role of the integrity of lipid rafts on V-ATPase activity in osteoclasts. *J Bone Miner Metab*.

Sabri, A., and Steinberg, S.F. (2003) Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure. *Mol Cell Biochem* **251**: 97-101.

Salgado, V.L. (1992) Slow voltage-dependent block of sodium channels in crayfish nerve by dihydropyrazole insecticides. *Mol Pharmacol* **41**: 120-126.

Sangameswaran, L., Fish, L.M., Koch, B.D., Rabert, D.K., Delgado, S.G., Ilnicka, M., Jakeman, L.B., Novakovic, S., Wong, K., Sze, P., Tzoumaka, E., Stewart, G.R., Herman, R.C., Chan, H., Eglen, R.M., and Hunter, J.C. (1997) A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *J Biol Chem* **272**: 14805-14809.

Sant, M., Allemani, C., Capocaccia, R., Hakulinen, T., Aareleid, T., Coebergh, J.W., Coleman, M.P., Grosclaude, P., Martinez, C., Bell, J., Youngson, J., and Berrino, F. (2003) Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *Int J Cancer* **106**: 416-422.

Sasaki, S., Horacsek, M., and Kesteloot, H. (1993) An ecological study of the relationship between dietary fat intake and breast cancer mortality. *Prev Med* **22**: 187-202.

Sasaki, T., Kobayashi, Y., Shimizu, J., Wada, M., In'nami, S., Kanke, Y., and Takita, T. (1998) Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer* **30**: 137-143.

Sastry, K.S., Karpova, Y., Prokopovich, S., Smith, A.J., Essau, B., Gersappe, A., Carson, J.P., Weber, M.J., Register, T.C., Chen, Y.Q., Penn, R.B., and Kulik, G. (2007) Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation. *J Biol Chem* **282**: 14094-14100.

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, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2001) The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* **409**: 1047-1051.

Scheuer, T. (1994) Structure and function of voltage-gated sodium channels: regulation by phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **22**: 479-482.

Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Bromme, D., Chapman, H.A., and Silverman, G.A. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**: 5258-5266.

Schley, P.D., Jijon, H.B., Robinson, L.E., and Field, C.J. (2005) Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **92**: 187-195.

Schley, P.D., Brindley, D.N., and Field, C.J. (2007) (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* **137**: 548-553.

Schmidt, H., and Schmitt, O. (1974) Effect of aconitine on the sodium permeability of the node of Ranvier. *Pflugers Arch* **349**: 133-148.

Schmidt, J.W., and Catterall, W.A. (1987) Palmitylation, sulfation, and glycosylation of the alpha subunit of the sodium channel. Role of post-translational modifications in channel assembly. *J Biol Chem* **262**: 13713-13723.

Schmitz, G., and Grandl, M. (2008) Update on lipid membrane microdomains. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**: 106-112.

Schonherr, R. (2005) Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* **205**: 175-184.

Schreibmayer, W., Dascal, N., Lotan, I., Wallner, M., and Weigl, L. (1991) Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel alpha-subunits expressed in Xenopus oocytes. *FEBS Lett* **291**: 341-344.

Schreibmayer, W., Frohnwieser, B., Dascal, N., Platzer, D., Spreitzer, B., Zechner, R., Kallen, R.G., and Lester, H.A. (1994) Beta-adrenergic modulation of currents produced by rat cardiac Na+ channels expressed in Xenopus laevis oocytes. *Receptors Channels* **2**: 339-350.

Schubert, B., VanDongen, A.M., Kirsch, G.E., and Brown, A.M. (1989) Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science* **245**: 516-519.

Schwab, J.M., and Serhan, C.N. (2006) Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **6**: 414-420.

Seki, H., Tani, Y., and Arita, M. (2009) Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**: 126-130.

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.

Serowy, S., Saparov, S.M., Antonenko, Y.N., Kozlovsky, W., Hagen, V., and Pohl, P. (2003) Structural proton diffusion along lipid bilayers. *Biophys J* **84**: 1031-1037.

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.

Sherman, S.J., and Catterall, W.A. (1984) Electrical activity and cytosolic calcium regulate levels of tetrodotoxin-sensitive sodium channels in cultured rat muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 262-266.

Shivdasani, R.A. (2006) MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* **108**: 3646-3653.

Shlyonsky, V.G., Mies, F., and Sariban-Sohraby, S. (2003) Epithelial sodium channel activity in detergent-resistant membrane microdomains. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F182-188.

Sigel, E., and Baur, R. (1988) Activation of protein kinase C differentially modulates neuronal Na+, Ca2+, and gamma-aminobutyrate type A channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6192-6196.

Simonsen, N., van't Veer, P., Strain, J.J., Martin-Moreno, J.M., Huttunen, J.K., Navajas, J.F., Martin, B.C., Thamm, M., Kardinaal, A.F., Kok, F.J., and Kohlmeier, L. (1998) Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. *Am J Epidemiol* **147**: 342-352.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., and Anderson, R.G. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10104-10108.

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.

Smith, R.D., and Goldin, A.L. (1997) Phosphorylation at a single site in the rat brain sodium channel is necessary and sufficient for current reduction by protein kinase A. *J Neurosci* **17**: 6086-6093.

Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Adami, H.O., Beeson, W.L., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Fraser, G.E., Freudenheim, J.L., Goldbohm, R.A., Graham, S., Kushi, L.H., Miller, A.B., Rohan, T.E., Speizer, F.E., Toniolo, P., Willett, W.C., Wolk, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., and Hunter, D.J. (2001) Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* **92**: 767-774.

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.

Starmer, C.F., Grant, A.O., and Strauss, H.C. (1984) Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics. *Biophys J* **46**: 15-27.

Staub, O., and Rotin, D. (1996) WW domains. *Structure* **4**: 495-499.

Steinberg, S.F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **88**: 1341-1378.

Steinhart, H., Rickert, R., and Winkler, K. (2003) Trans fatty acids (TFA): analysis, occurrence, intake and clinical relevance. *Eur J Med Res* **8**: 358-362.

Stillwell, W., Shaikh, S.R., Zerouga, M., Siddiqui, R., and Wassall, S.R. (2005) Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod Nutr Dev* **45**: 559-579.

Stock, C., and Schwab, A. (2006) Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration. *Acta Physiol (Oxf)* **187**: 149-157.

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.

Surmeier, D.J., and Kitai, S.T. (1993) D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* **99**: 309-324.

Suzuki, I., Iigo, M., Ishikawa, C., Kuhara, T., Asamoto, M., Kunimoto, T., Moore, M.A., Yazawa, K., Araki, E., and Tsuda, H. (1997) Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Int J Cancer* **73**: 607-612.

Suzuki, R., Orsini, N., Mignone, L., Saji, S., and Wolk, A. (2008) Alcohol intake and risk of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* **122**: 1832-1841.

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.

Taddei, I., Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fassler, R., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2008) Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* **10**: 716-722.

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.

Tedone, T., Correale, M., Barbarossa, G., Casavola, V., Paradiso, A., and Reshkin, S.J. (1997) Release of the aspartyl protease cathepsin D is associated with and facilitates human breast cancer cell invasion. *Faseb J* **11**: 785-792.

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.

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.

Teuliere, J., Faraldo, M.M., Deugnier, M.A., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2005) Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**: 267-277.

Thimmapaya, R., Neelands, T., Niforatos, W., Davis-Taber, R.A., Choi, W., Putman, C.B., Kroeger, P.E., Packer, J., Gopalakrishnan, M., Faltynek, C.R., Surowy, C.S., and Scott, V.E. (2005) Distribution and functional characterization of human Nav1.3 splice variants. *Eur J Neurosci* **22**: 1-9.

Thoennes, S.R., Tate, P.L., Price, T.M., and Kilgore, M.W. (2000) Differential transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by omega-3 and omega-6 fatty acids in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* **160**: 67-73.

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.

Tikhonov, D.B., and Zhorov, B.S. (2005) Sodium channel activators: model of binding inside the pore and a possible mechanism of action. *FEBS Lett* **579**: 4207-4212.

Tillman, T.S., and Cascio, M. (2003) Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem Biophys* **38**: 161-190.

Tlsty, T.D., and Coussens, L.M. (2006) Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* **1**: 119-150.

Trimmer, J.S., Cooperman, S.S., Tomiko, S.A., Zhou, J.Y., Crean, S.M., Boyle, M.B., Kallen, R.G., Sheng, Z.H., Barchi, R.L., Sigworth, F.J., and et al. (1989) Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* **3**: 33-49.

Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., and Bieth, J.G. (1993) Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* **32**: 375-380.

Turk, B., Turk, V., and Turk, D. (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* **378**: 141-150.

Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 98-111.

Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 785-799.

Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., and Turk, B. (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* **379**: 137-147.

Turk, V., and Bode, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* **285**: 213-219.

Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J* **20**: 4629-4633.

Turk, V., Turk, B., Guncar, G., Turk, D., and Kos, J. (2002) Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul* **42**: 285-303.

Turk, V., Kos, J., and Turk, B. (2004) Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* **5**: 409-410.

Ulbricht, W. (1969) The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergeb Physiol* **61**: 18-71.

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.

Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B.S., Almholt, K., Bogyo, M., Peters, C., and Reinheckel, T. (2006) Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* **66**: 5242-5250.

Vijayaragavan, K., Boutjdir, M., and Chahine, M. (2004) Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol* **91**: 1556-1569.

Vilin, Y.Y., Makita, N., George, A.L., Jr., and Ruben, P.C. (1999) Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys J* **77**: 1384-1393.

Vilin, Y.Y., Fujimoto, E., and Ruben, P.C. (2001) A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na+ channel slow inactivation. *Biophys J* **80**: 2221-2230.

Villalonga, N., Ferreres, J.C., Argiles, J.M., Condom, E., and Felipe, A. (2007) Potassium channels are a new target field in anticancer drug design. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**: 212-223.

Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., and Pecker, I. (1999) Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* **5**: 793-802.

Vora, T., Corry, B., and Chung, S.H. (2005) A model of sodium channels. *Biochim Biophys Acta* **1668**: 106-116.

Waechter, C.J., Schmidt, J.W., and Catterall, W.A. (1983) Glycosylation is required for maintenance of functional sodium channels in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **258**: 5117-5123.

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.

Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., Kalluri, R., and Shi, G.P. (2006) Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* **281**: 6020-6029.

Wang, S.Y., and Wang, G.K. (2003) Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal* **15**: 151-159.

Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924) Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem. Z.* **152**: 319-344.

Welsch, C.W. (1987) Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* **45**: 192-202.

Wendel, M., and Heller, A.R. (2009) Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem* **9**: 457-470.

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, W., Faull, R., Waldvogel, H., Plumpton, C., Burbidge, S., Emson, P., and Clare, J. (1999) Localization of the type VI voltage-gated sodium channel protein in human CNS. *Neuroreport* **10**: 3703-3709.

Whitaker, W.R., Clare, J.J., Powell, A.J., Chen, Y.H., Faull, R.L., and Emson, P.C. (2000) Distribution of voltage-gated sodium channel alpha-subunit and beta-subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J Comp Neurol* **422**: 123-139.

Willett, W.C. (1995) Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 8**: 165-170.

Williams, E.E., May, B.D., Stillwell, W., and Jenski, L.J. (1999) Docosahexaenoic acid (DHA) alters the phospholipid molecular species composition of membranous vesicles exfoliated from the surface of a murine leukemia cell line. *Biochim Biophys Acta* **1418**: 185-196.

Wingo, T.L., Shah, V.N., Anderson, M.E., Lybrand, T.P., Chazin, W.J., and Balser, J.R. (2004) An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 219-225.

Wonderlin, W.F., and Strobl, J.S. (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* **154**: 91-107.

Wynder, E.L., Rose, D.P., and Cohen, L.A. (1986) Diet and breast cancer in causation and therapy. *Cancer* **58**: 1804-1813.

Xia, S.H., Wang, J., and Kang, J.X. (2005) Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* **26**: 779-784.

Xiao, G.Q., Qu, Y., Sun, Z.Q., Mochly-Rosen, D., and Boutjdir, M. (2001) Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na(+) channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**: C1477-1486.

Xiao, R.P., Cheng, H., Zhou, Y.Y., Kuschel, M., and Lakatta, E.G. (1999) Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res* **85**: 1092-1100.

Xiao, Y.F., Kang, J.X., Morgan, J.P., and Leaf, A. (1995) Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na+ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11000-11004.

Xiao, Y.F., Wright, S.N., Wang, G.K., Morgan, J.P., and Leaf, A. (1998) Fatty acids suppress voltage-gated Na+ currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na+ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2680-2685.

Xiao, Y.F., Wright, S.N., Wang, G.K., Morgan, J.P., and Leaf, A. (2000) Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**: H35-46.

Xing, R., Addington, A.K., and Mason, R.W. (1998) Quantification of cathepsins B and L in cells. *Biochem J* **332 (Pt 2)**: 499-505.

Xiong, W., Li, R.A., Tian, Y., and Tomaselli, G.F. (2003) Molecular motions of the outer ring of charge of the sodium channel: do they couple to slow inactivation? *J Gen Physiol* **122**: 323-332.

Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., and Krutovskikh, V. (1995) Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res* **333**: 181-188.

Yanagita, T., Kobayashi, H., Uezono, Y., Yokoo, H., Sugano, T., Saitoh, T., Minami, S., Shiraishi, S., and Wada, A. (2003) Destabilization of Na(v)1.7 sodium channel alpha-subunit mRNA by constitutive phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase: negative regulation of steady-state level of cell surface functional sodium channels in adrenal chromaffin cells. *Mol Pharmacol* **63**: 1125-1136.

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, N., George, A.L., Jr., and Horn, R. (1997) Probing the outer vestibule of a sodium channel voltage sensor. *Biophys J* **73**: 2260-2268.

Yao, X., and Kwan, H.Y. (1999) Activity of voltage-gated K+ channels is associated with cell proliferation and Ca2+ influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci* **65**: 55-62.

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.

Young, K.A., and Caldwell, J.H. (2005) Modulation of skeletal and cardiac voltage-gated sodium channels by calmodulin. *J Physiol* **565**: 349-370.

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, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., and Catterall, W.A. (2005) Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* **57**: 387-395.

Yuen, A.R., Halsey, J., Fisher, G.A., Holmlund, J.T., Geary, R.S., Kwoh, T.J., Dorr, A., and Sikic, B.I. (1999) Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin Cancer Res* **5**: 3357-3363.

Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**: 537-548.

Zerouga, M., Stillwell, W., Stone, J., Powner, A., and Jenski, L.J. (1996) Phospholipid class as a determinant in docosahexaenoic acid's effect on tumor cell viability. *Anticancer Res* **16**: 2863-2868.

Zhang, R.D., Fidler, I.J., and Price, J.E. (1991) Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis* **11**: 204-215.

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.

Zimmer, T., and Benndorf, K. (2002) The human heart and rat brain IIA Na+ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. *J Gen Physiol* **120**: 887-895.

Zimmer, T., Biskup, C., Dugarmaa, S., Vogel, F., Steinbis, M., Bohle, T., Wu, Y.S., Dumaine, R., and Benndorf, K. (2002) Functional expression of GFP-linked human heart sodium channel (hH1) and subcellular localization of the a subunit in HEK293 cells and dog cardiac myocytes. *J Membr Biol* **186**: 1-12.

Ludovic GILLET

IMPLICATION DES CANAUX SODIQUES DÉPENDANTS DU VOLTAGE DANS L'INVASIVITÉ DE CELLULES CANCÉREUSES MAMMAIRES ET RÉGULATION PAR L'ACIDE DOCOSAHEXAÈNOÏQUE

Résumé

L'expression de canaux sodiques dépendants du voltage (Na_V) est associée au caractère invasif de certains cancers épithéliaux. Nous avons montré que dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231, l'expression anormale de $Na_V1.5$ était responsable d'un courant sodique soutenu au potentiel de membrane des cellules. Ces canaux ne régulent pas la proliferation cellulaire, mais augmentent l'invasion de la matrice extracellulaire. L'activité de $Na_V1.5$ entraîne une acidification périmembranaire favorable à l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine B et S, qui jouent un rôle prédominant dans l'invasivité. La co-localisation du Na_V et des régulateurs du pH dans des microdomaines membranaires pourrait favoriser cet effet. L'acide docosahexaènoïque (DHA, 22:6n-3), un acide gras polyinsaturé de la série n-3 (AGPI n-3), est connu pour son effet protecteur dans le cancer du sein, mais aussi pour moduler l'activité des canaux ioniques. Nous avons étudié son rôle sur l'invasivité et sur l'activité du Na_V. Notre étude suggère que l'apport de DHA réduit l'invasivité des cellules MDA-MB-231 en diminuant l'activité du $Na_V1.5$. Ceci pourrait constituer un nouveau mécanisme des effets protecteurs des AGPI n-3.

Mots-clés : cancer du sein, canaux sodiques dépendants du voltage, invasivité, cathepsines à cystéine, acides gras polyinsaturés n-3, microdomaines membranaires

Abstract

Voltage-gated sodium channels (Na_V) are expressed in highly metastatic cancer cells derived from epithelial tissues. In the highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-231, we showed that the abnormal expression of $Na_V1.5$ was responsible for a sustained inward sodium current at the steady-state membrane voltage. These channels do not regulate cell multiplication but promote the invasion of the extracellular matrix. We found that $Na_V1.5$ activity leads to a perimembrane acidification favourable for the pH-dependent proteolytic activity of cysteine cathepsins B and S, which play a predominant role in cell invasiveness. Colocalisation of Na_V and pH regulators in membrane raft domains could promote this effect. Since n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) has been reported to reduce the aggressiveness of some breast cancers, and to be a modulator of ion channels, we chose to study its role on cell invasiveness and Na_V activity. Our work suggests that a chronic intake of DHA reduces MDA-MB-231 cells invasiveness by decreasing Na_V activity. This could be a new mechanism for the metastasis preventing effect of n-3 PUFA.

Keywords: breast cancer, voltage-gated sodium channels, invasiveness, cysteine cathepsins, n-3 polyunsaturated fatty acids, membrane microdomains