

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM UMR 1069, « Nutrition, Croissance et Cancer »

THÈSE présentée par :

Yann FOURBON

Soutenue le 6 Octobre 2017

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

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

**Régulation de la migration des cellules
cancéreuses coliques HCT-116 par la sous-
unité $\alpha 1D$ et du canal SK3 par la voie
AMPC-PKA**

THÈSE encadrée par :

Monsieur VANDIER Christophe Professeur des Universités, Université François–Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur PENNA Aubin Chargé de Recherche, HDR, Université de Poitiers

Monsieur GAUTIER Mathieu Professeur des Universités, Université d'Amiens

JURY :

Monsieur ROUDBARAKI Morad Professeur des Universités, Université de Lille

Monsieur VANDIER Christophe Professeur des Universités, Université François–Rabelais de Tours

Madame CHANTOME Aurélie Ingénieur de Recherche, Université François – Rabelais de Tours

Monsieur PENNA Aubin Chargé de Recherche, HDR, Université de Poitiers

Monsieur GAUTIER Mathieu Professeur des Universités, Université d'Amiens

A ma mère, à mon épouse.

Mireille et Amandine.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail en Octobre prochain. Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse pour avoir consacré de leur temps à l'étude de ce travail. J'adresse un grand merci au Professeur Mathieu Gautier et au Chercheur Aubin Penna d'avoir pris le temps de relire ce travail avec attention en tant que rapporteurs de cette thèse. J'espère que je serais à la hauteur des questions et discussions que nous pourrions avoir lors de la soutenance.

Je remercie également le Professeur Morad Roudbaraki pour avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance de thèse et d'apporter son expertise sur la qualité des travaux effectués.

Je remercie le Professeur Stéphan Chevalier de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer depuis le Master 1 et jusqu'à la fin de cette thèse. Merci également pour l'intérêt avec lequel vous avez assisté à mes présentations de résultats pendant ces cinq dernières années.

Un grand merci à mes co-directeurs de thèse, le Professeur Christophe Vandier et le Docteur Aurélie Chantôme pour m'avoir encadré et conseillé durant ces années passées au laboratoire. Vous m'avez accueilli, fait confiance et offert l'opportunité de développer mes connaissances et compétences dès mon stage de Master 1. Vous avez reconduit cette confiance en me confiant ce projet de thèse suite au Master 2. Ces 3 années de thèse n'ont pas toujours été rose, j'ai eu des périodes de creux dans les manipulations avec des problèmes récurrents de contaminations et des difficultés dans les constructions des plasmides, mais vous avez toujours été derrière moi à me conseiller et à me soutenir. J'ai apprécié travailler avec vous et je vous l'avoue, je me suis « éclaté » sur l'installation de patch-clamp. Je te remercie Aurélie, d'avoir été aussi patiente malgré ma tête de mule confirmée, à m'obstiner sur un protocole qui pourtant ne marche pas et que je persiste à faire, ainsi que de m'avoir donné tes astuces et bons tuyaux pour les manipulations.

Je souhaite remercier également le Professeur Patrick Bois qui fut comme un second mentor pour moi lors des manipulations d'électrophysiologie et je souhaite le remercier pour le temps qu'il a pu me consacrer à l'apprentissage de la technique de patch perforé de même

que d'avoir pris du temps pour m'aider à avancer dans ce travail de thèse et de la rédaction de l'article.

Je souhaite également remercier le Professeur Bruno Constantin pour son expertise et son aide dans les analyses d'immunofluorescence et dans la rédaction et l'élaboration de l'article.

Je remercie Marie Potier-Cartereau pour son soutien et ses conseils durant les travaux expérimentaux de l'article, ainsi que pour la relecture de mon manuscrit de thèse.

Merci à Romain pour ton expérience et tes conseils pour les expériences en Ca^{2+} sur cellules adhérentes. J'ai apprécié nos discussions dans le bureau et lors de congrès sur la famille, le laboratoire, les petites recettes de cuisine... tant de conversations qui m'ont permis de souffler un peu et de penser à autre chose avant de reprendre avec plus d'entrain le travail.

Merci à Catherine pour ton aide et ta gentillesse lors de mes soucis de commandes et de remboursements de frais.

Merci à tata Isa d'avoir pris du temps pour m'aider lors de mes périodes de solitude devant les contaminations en culture et de m'avoir écouté lors de mes petits moments de doute et de craquages nerveux durant la rédaction. Aussi, Isa, promis je vais ranger mon bazar et jeter mes boîtes de « la réserve écureuil » comme tu as su si bien le dire. Encore merci Isa.

Merci Emiliane pour ton oreille bienveillante lors de besoins irrépessibles de bavardages que j'ai eu en cette fin de thèse. Merci aussi pour tes petits piques, lors de nos discussions et clins d'œil qui m'ont beaucoup amusé. Je te souhaite bonne chance pour la suite et de décrocher ce poste de maître de conférence que tu désires tant.

Je souhaite remercier tous les autres membres du laboratoire N2C qui ont rendu ces 3 années de thèse et ces deux années de Master agréables et chaleureuses.

Merci aussi à Alain Moreau pour son aide dans la réalisation des séquençages de mes constructions avec mes différents plasmides.

Merci aux anciens, les « vieux thésards » et post-doc, qui m'avez accueilli et guidé dans mes débuts au laboratoire en me refillant les bons tuyaux pour pourvoir forger la pipette parfaite en forme et résistance pour le patch ou pour l'obtention du plus joli Western-Blot.

Merci donc à Ramez, Fabio, Bilel, Julie, Emeline, Audrey, Lucie, Laure, Virginie, Ana, Jorge et Lucie.

Merci également à mon capitaine Maxime, qui vogue aujourd'hui vers de nouveaux horizons. Le temps passé en ta compagnie a été la meilleure période que j'ai eu au laboratoire. J'espère que tu trouveras un poste à la hauteur de tes capacités car tu le mérites bonhomme.

Je remercie aussi Fred, co-thésard et compagnon de galère. Nous n'avons pas beaucoup échangé nos points de vue, mais nous nous comprenions par un regard, un sourire. Je te souhaite bon courage et ténacité en cette fin de thèse. Puisse-tu terminer au plus vite les manipulations et rédiger ta thèse.

Je souhaite également un très bon courage et surtout de ne pas baisser les bras devant l'adversité aux recrues déjà arrivées en 3^{èmes} années de thèse : Sandy, Adeline et Céline. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, nos petits moments de craquages nerveux et autres moments décalés. Sandy, aies confiance, tu fais une bonne thèse, veilles bien sur Isa. Adeline, tu es forte et courageuse, tu t'en sortiras même si tu dois faire ta thèse en 4 ans. Accroches toi, tu as des copines autour de toi pour te soutenir et t'encourager. Céline, aies plus confiance en toi, tu as un potentiel énorme.

Merci aussi aux petits nouveaux thésards, jeunes poussins, Delphine, Sana, Chahrazed et Lucile. Vous êtes toutes adorables et vous allez dynamiser le laboratoire en réveillant tout ce petit monde. N'hésitez pas à aller vers les anciens thésards pour monter des collaborations. Aussi, soyez compréhensives avec vos encadrants et n'hésitez pas à aller leur poser des questions lors de vos moments de doutes, chose que moi-même je n'ai pas assez fait et que je peux regretter aujourd'hui.

Je remercie ma famille, mes proches et mes amis pour m'avoir depuis le début de mes études, en commençant par les années fac à Poitiers, soutenu tout du long et d'avoir cru en moi. Je remercie mes amis de Buxerolles, Sylvie, Jean-Marie et Catherine, de même que mes petits voisins Corinne, Alain, Véronique, Marie-Rose, Hélène et Claire... et Jean-Jacques que je n'oublie pas et que j'embrasse.

Je remercie aussi, à ma façon, mes animaux chéris, qui m'ont apporté plus de joie et de bonheur que je n'aurais pu espérer, même s'ils n'ont eu de cesse de me distraire et de me tenter de jouer à la baballe où à l'élastique plutôt que de rester concentré et studieux.

Je remercie mon oncle Michel et ma tante Brigitte de m'avoir, à leur manière, apporté leur soutien. J'espère avoir répondu à leurs attentes dans ma dévotion dans les études et qu'ils sont fiers de leur neveu.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, ma mère Mireille et mon père Patrick, qui ont toujours fait en sorte que je ne manque jamais de rien quitte à me couvrir, à me surprotéger et à délaissé leur santé :

A mon Père, je dirai que je te dois beaucoup plus que ce que tu peux te douter. Nos petits moments complices à refaire le monde ou même nos disputes et chamailleries ont créé entre nous une relation unique. Je souhaite que nous ayons davantage, dans l'avenir, de moments privilégiés entre « mecs », en commençant par exemple par se remettre à la pêche, car il me tarde de retrouver ces sensations du titillement du bouchon. Merci encore papa et merci pour ta tournure maintenant culte et incontournable pour moi du « Avé Thésard » qui m'a si souvent redonné le sourire.

A ma Mère, je dirai pour commencer que je t'aime et que si ton opération a été une renaissance pour toi, elle a été pour moi une véritable plaie. Chaque jour qui passe et où je te vois aussi fatiguée me dit que tout pourrait recommencer. Maman, tu es et tu resteras toujours mon unique trésor. Je voulais par cette thèse te prouver que tout combat mérite d'être livré, aussi dur soit-il, du moment que l'issue en vaille la peine. Ces dernières années, j'ai plus joué le rôle du père que du fils mais je ne regrette rien. Tu as su faire preuve d'une grande combativité et d'un mental que je t'envie et que j'espère avoir aussi le moment venu. Cette thèse, je te la dédie. Tu veilles aujourd'hui sur mon Amandine, demain se sera sur tes petits-enfants. Je t'aime Maman.

A mon Amandine, ma femme, ma vie. Je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui si tu n'avais pas été là pour moi. J'aimais te dire, il y a encore quelques temps, que tu n'étais encore qu'une petite ourse et qu'un beau jour tu t'épanouirais en grande ourse. Mais la vérité est que c'est moi qui ai le plus appris de l'autre. Partir chaque lundi matin et te laisser seule jusqu'au Vendredi soir d'après, ou dans les derniers temps, te rendre juste une visite éclair, a été pour moi le plus difficile à vivre et à supporter durant ces 3 années. Tu as toujours su m'écouter, me calmer, me rassurer dans les moments où j'allais le plus mal, dans les instants où je sombrais, tu as su me relever. Je te remercie pour ton soutien en tout instant et surtout pour ta patience car je sais que je n'ai pas toujours été agréable et que je m'emporte assez vite. Je n'ai pas dû te rendre toutes mes visites agréables et j'en suis désolé. J'espère que tu es

fière de ce que ton « Nanou » est devenu et que tous ces efforts seront récompensés très prochainement par un bon travail pour moi et une promotion de ton côté. Je t'aime ma petiotte et je pense que notre couple a progressé et mûri durant ces 3 années. J'espère aussi que, dans un avenir proche, nous puissions compter sur une petite tête blonde de plus à la maison, mais que si elle a mon caractère et ton tempérament, je connais deux petits vieux à la maison qui n'ont pas fini de s'arracher les cheveux. Je te remercie également d'aussi bien t'occuper de mes parents, la bonne entente entre vous trois et cette confiance réciproque ont été un véritable bonheur et m'ont permis d'aller accomplir cette thèse en ayant l'assurance que tout aille pour le mieux à la maison.

Je t'aime mon Amandine.

Mes derniers mots seront pour mes grands-parents, partis depuis trop longtemps déjà et qui ne cessent de me manquer cruellement chaque jour qui passe. Je dédie, en quelque sorte, également cette thèse à vous quatre, à mes papis Jean et Maurice et à mes mamies Mathilde et Yvette. J'espère, sait-on jamais, que vous avez pu m'observer et voir mon évolution depuis mon adolescence jusqu'à mon mariage et maintenant à la consécration de cette thèse. Je ne doute pas que vous auriez été fiers de ce qu'est devenu votre unique petit-fils, mais je tiens à vous dire que j'ai été comblé par votre amour et votre protection durant ces quelques années passées à vous connaître.

Je vous aime.

Pour terminer, j'ajouterai qu'il est tout à fait vrai qu'il n'y a pas de rêves trop grands ni de rêveurs trop petits, mais que la volonté seule ne suffit pas et qu'il faut mettre tout son cœur à l'ouvrage pour accomplir un tel travail que celui d'une thèse. Cette expérience restera à jamais gravée dans ma mémoire et sera, il est certain, une grande force dans laquelle je saurai puiser tout du long de ma carrière professionnelle.

Yann Fourbon

Résumé

Des études récentes désignent les canaux ioniques comme de nouvelles cibles très prometteuses pour des thérapies spécifiques anticancéreuses. Leur expression est altérée dans de nombreux cancers de l'homme et est fréquemment corrélée à l'agressivité de la tumeur. En règle générale, les canaux ioniques exercent des effets pléiotropes sur la physiologie des cellules néoplasiques. Par exemple, en régulant le potentiel de membrane, les canaux contrôlent la concentration de Ca^{2+} cytosolique et en conséquence la mobilité cellulaire et le développement de métastases. Toutefois, si leur implication est de plus en plus démontrée, la régulation et les mécanismes moléculaires associés aux canaux ioniques, dans un contexte tumoral, restent à être précisés. Sans surprise, les mécanismes régulant l'activité et/ou l'expression des canaux ioniques sont multiples et font intervenir une cascade de voies de signalisations intracellulaires généralement déclenchées après formation de complexes protéiques avec d'autres protéines membranaires, telles que les intégrines ou les récepteurs de facteur de croissance. Enfin, dans un contexte tumoral, les canaux ioniques sont généralement détournés de leur fonction première pour participer à un phénotype tumoral.

Il a été montré au laboratoire que le canal SK3 (canal K^+ de petite conductance activé par le Ca^{2+} intracellulaire) favorise la migration de cellules cancéreuses dont celles du cancer du côlon HCT-116. Ce canal est localisé dans des nanodomains riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques, avec le canal calcique Orai1 et est responsable de l'activation d'entrées constitutives de Ca^{2+} ainsi que celles dépendantes des réserves Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. Par ailleurs, l'activité du canal SK3 est régulée négativement par l'activation de la voie AMPc-PKA secondairement à la phosphorylation du canal par la PKA ainsi que par un éther-lipide de synthèse l'Ohmline (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-Lactose).

Mon projet de thèse avait pour objectifs : 1) de caractériser les voies d'entrées du Ca^{2+} dans les cellules cancéreuses du côlon HCT-116 et plus particulièrement le rôle de la sous-unité $\alpha 1D$ du canal Ca^{2+} dépendant du potentiel CaV1.3 et 2) d'identifier les résidus sérine du canal SK3 responsables de son inhibition par l'activation de la voie AMPc-PKA et de tester l'hypothèse selon laquelle l'Ohmline favorise la phosphorylation du canal SK3 par la voie AMPc-PKA.

Il est généralement admis que les canaux Ca^{2+} voltage dépendant, CaVs, régulent l'homéostasie Ca^{2+} des cellules excitables suite à une dépolarisation de la membrane plasmique. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux rôles des CaVs dans les cellules dites non excitables et en particulier dans les cellules épithéliales cancéreuses. Des méta-

analyses ont montré que l'expression des gènes codant pour des sous-unités constitutives des CaVs est augmentée dans divers cancers. Le gène *CACNA1D* de la sous-unité $\alpha 1D$ du CaV1.3 est retrouvé surexprimé dans cette analyse et en particulier dans le cancer du côlon. Le but de cette étude a été d'étudier le rôle de la protéine $\alpha 1D$, protéine qui forme le pore du canal CaV1.3, dans la biologie des cellules épithéliales cancéreuses coliques non excitables, les HCT-116. Nos études montrent que la protéine $\alpha 1D$ est surexprimée dans les biopsies de cancer colorectal par rapport aux tissus normaux. Des ARN interférentiels dirigés contre la protéine $\alpha 1D$, réduisent la migration et l'invasion des HCT-116. Ces siRNA réduisent la concentration basale de Ca^{2+} cytosolique et ont modifié la fréquence des oscillations du Ca^{2+} induites par l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} fonctionnant en mode reverse. Par ailleurs, l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} et plus précisément les NCX1 / 3 (tous les 2 exprimés dans les HCT-116) régulent le potentiel de membrane des cellules HCT-116, lorsque l'expression de la protéine $\alpha 1D$ est supprimée par les siRNA. Ces résultats suggèrent que l'invalidation de la protéine $\alpha 1D$ favoriserait l'activité de l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} , ce qui va diminuer la concentration de Ca^{2+} basale cytosolique et réduire par conséquent la migration des HCT-116. Cependant, la dépolarisation de la membrane plasmique n'induit pas d'augmentation de la concentration basale du Ca^{2+} cytosolique. Les expériences de patch-clamp montrent clairement que le courant Ca^{2+} entrant est absent. Les études de cytométrie en flux et d'immunofluorescence ont montré que la protéine $\alpha 1D$ était localisée à la membrane plasmique, dans le cytosol ainsi que dans les noyaux cellulaires. Ainsi, nous avons découvert une nouvelle voie de signalisation montrant que la protéine $\alpha 1D$ est impliquée dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} ainsi que dans la migration cellulaire par un mécanisme indépendant de sa fonction canonique à la membrane plasmique des cellules HCT-116. Cette régulation impliquerait l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} de la membrane plasmique.

Le second objectif de ma thèse a été d'identifier les résidus sérine du canal SK3 responsables de son inhibition par l'activation de la voie AMPc-PKA et de tester l'hypothèse selon laquelle l'Ohmlin favorise la phosphorylation du canal SK3 par la voie AMPc-PKA. En effet, nous savons que l'Ohmlin et l'activation de la voie AMPc-PKA inhibent l'activité du canal SK3 et dissocient le complexe SK3-Orai1 suggérant des mécanismes d'action communs. L'activation de la voie AMPc-PKA a été réalisée en appliquant aux cellules de la forskoline (FSK, activateur de l'adénylate cyclase) et du CI-1044 (inhibiteur des phosphodiésterases de type IV). Nos résultats ont montré que la mutation de la sérine 285 du canal SK3 de rat réduisait de 43% l'effet inhibiteur de la FSK + CI-1044 sur le canal. Par ailleurs, cette mutation ponctuelle a complètement bloqué l'effet inhibiteur de la FSK+ CI-

1044 sur la migration des cellules HEK293T transfectées avec le canal SK3 de rat muté. Nous avons ensuite testé l'effet de la FSK + CI-1044 sur le canal SK3 humain ainsi que sur un canal SK3 humain étiqueté en N-terminale avec un motif HA que nous avons développé. L'activation de la voie AMPc-PKA par la FSK + CI-1044 a réduit de façon identique l'amplitude des courants SK3 humains étiquetés ou pas en N-terminale. La mutation de la serine 289 (équivalente à la serine 285 chez la rat) a réduit l'effet inhibiteur de la FSK + CI-1044 sur le canal SK3 humain de 46%. Par ailleurs, les mutations de toutes les sérines en N-terminale du canal SK3 humain ont réduit davantage l'effet inhibiteur de la FSK + CI-1044 sur ce canal, mais ne l'ont pas complètement supprimé. Ces résultats montrent que la sérine 289 est une sérine importante responsable de la moitié des effets inhibiteurs de la PKA, mais qu'il existe d'autres résidus cibles de la PKA probablement situés sur l'extrémité C-terminale du canal. Afin de tester si l'Ohmlin inhibe l'activité du canal SK3 en favorisant la phosphorylation du canal SK3 par l'activation de la voie AMPc-PKA, nous avons testé cet éther-lipide de synthèse sur le canal SK3 humain non muté et pour lequel les quatre sérines en position N-terminale ont été mutées. Nos résultats montrent que quel que soit le canal, muté ou non, l'Ohmlin possède toujours la même capacité à réduire l'amplitude des courants SK3. Ces résultats montrent que les mutations en N-terminale n'ont pas modifié la sensibilité du canal SK3 à l'Ohmlin et que ce lipide ne réduit pas l'activité du canal SK3 en favorisant la phosphorylation de la partie N-terminale du canal SK3 par l'activation de la voie AMPc-PKA.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de découvrir une nouvelle voie de signalisation impliquant la protéine $\alpha 1D$ dans le cancer du côlon et qui pourrait être une cible thérapeutique intéressante. En parallèle, nous avons identifié des résidus sérine du canal SK3 qui sont importants dans la régulation négative du canal SK3 par l'activation de la voie AMPc-PKA.

Mots-clés : protéine $\alpha 1D$, canal CaV1.3, canal SK3, Ca^{2+} , AMPc, PKA, cellules cancéreuses du côlon, migration cellulaire.

Abstract

Recent studies show that ion channels are promising new targets for anticancer therapies. Their expression is altered in many human cancers and frequently correlated with tumor aggressiveness. Ion channels exert pleiotropic effects on the physiology of neoplastic cells. For example, by regulating the membrane potential, ion channels control the cytosolic Ca^{2+} concentration of thus cell mobility and the development of metastases. However, if their involvement is increasingly demonstrated, molecular mechanisms associated with ion channels in a tumor context remain to be clarified. Not surprisingly, the mechanisms regulating the activity and / or expression of ion channels are multiple and involve a cascade of intracellular signaling pathways generally triggered after the formation of protein complexes with other membrane proteins such as integrins or Growth factor receptors. Finally, in a tumor context, ion channels are generally hijacked from their primary physiological function to participate in the tumor phenotype.

It has been shown in the laboratory that the SK3 channel (small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel) promotes the migration of cancer cells including the migration of the colon cancer cell line HCT-116. This channel is located in the cholesterol-rich nanodomains, called lipid rafts, with the Ca^{2+} channel *Orai1* and is responsible for the activation of constitutive Ca^{2+} entry and for store operated Ca^{2+} entry. Furthermore, the activity of the SK3 channel is negatively regulated by the synthetic ether-lipid Ohmlin (1-O-Hexadecyl- 2-O-methyl-sn-glycero-Lactose) and by the activation of the cAMP-PKA pathway, secondarily to the phosphorylation of the channel by PKA.

The aims of my thesis project were: 1) to characterize the Ca^{2+} entries pathways in colon cancer cells HCT-116 and more particularly the role Ca^{2+} $\alpha 1\text{D}$ of the *CaV1.3* and 2) to identify serine residues of SK3 channel involved in its inhibition following activation of the cAMP-PKA pathway and to test the hypothesis that Ohmlin is acting on SK3 channel by activating its phosphorylation via the cAMP-PKA pathway.

It is generally accepted that voltage-gated Ca^{2+} channels, *CaV*, regulate Ca^{2+} homeostasis in excitable cells following plasma membrane depolarization. Here, we show that the Ca^{2+} protein $\alpha 1\text{D}$ of *CaV1.3* channel is overexpressed in colorectal cancer biopsies compared to normal tissues. Gene silencing experiments targeting $\alpha 1\text{D}$ reduced the migration and the basal cytosolic Ca^{2+} concentration of HCT-116 colon cancer cell line and modified the cytosolic Ca^{2+} oscillations induced by the *NCX1 / 3* working in its reverse mode. Interestingly, *NCX1 / 3* regulated membrane potential of HCT-116 cells only when $\alpha 1\text{D}$ is

silenced and blocking NCX1 / 3 increases cytosolic Ca^{2+} concentration and cell migration. However, membrane depolarization does not induce an increase in intracellular Ca^{2+} . Patch-clamp experiments clearly show that the inward Ca^{2+} current is absent. Finally, flow cytometry and immunofluorescence studies showed that $\alpha 1\text{D}$ protein is localized at the plasma membrane, in cytosol and cell nuclei. Altogether, we uncover a novel signaling pathway showing that $\alpha 1\text{D}$ is involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis and cell migration by a mechanism independent of its plasma membrane canonical function but that involved plasma membrane $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger.

The second aim of my thesis was to identify serine residues of SK3 channel involved in its inhibition following activation of the cAMP-PKA pathway and to test the hypothesis that Ohmlin is acting on SK3 channel by activating its phosphorylation via the cAMP-PKA pathway. Indeed, we have demonstrated that Ohmlin and the activation of the cAMP-PKA pathway inhibit the activity of the SK3 channel and dissociate the SK3-Orai1 complex suggesting common mechanisms of action. Activation of the cAMP-PKA pathway was performed by applying forskolin (FSK, adenylate cyclase activator) and CI-1044 (phosphodiesterase type IV inhibitor). Our results showed that the mutation of the serine 285 of the rat SK3 channel reduced the inhibitory effect of FSK + CI-1044 application on the channel by 43%. Moreover, this point mutation completely blocked the inhibitory effect of FSK + CI-1044 on the migration of HEK293T cells transfected by the mutated rat SK3 channel. We then tested the effect of FSK + CI-1044 on the human SK3 channel and on a human SK3 channel labeled in the N-terminal end with a HA tag that we have developed. Activation of the cAMP-PKA pathway by FSK + CI-1044 similarly reduced the amplitude of human SK3 currents labeled or not labeled. The mutation of serine 289 (equivalent to serine 285 for the rat SK3) reduced the inhibitory effect of FSK + CI-1044 on the human SK3 channel by 46%. Furthermore, mutations of all the four N-terminal end serines of the human SK3 channel further reduced the inhibitory effect of FSK + CI-1044 on this channel but did not suppress it. These results show that serine 289 is a major serine responsible for half of the PKA inhibitory effects on SK3 channel and that there are other PKA target residues likely located on the C-terminal end of the channel. In order to test whether Ohmlin inhibited SK3 channel activity by promoting the phosphorylation of the SK3 channel following the activation the cAMP-PKA pathway, we tested this synthetic ether-lipid on the non-mutated human SK3 channel and on SK3 channel for which the four serines in the N-terminal end were mutated. Our results show that whatever the channel, mutated or not, Ohmlin has the same ability to reduce the amplitude of the SK3 currents. These results show that the N-

terminal end mutations did not modify the sensitivity of the SK3 channel to Ohmlin and that this lipid did not reduce the activity of the N-terminal of SK3 channel by promoting the phosphorylation of the SK3 channel by activation of cAMP-PKA pathway.

In conclusion, in this work we discover a new signaling pathway involving the $\alpha 1D$ protein in colon cancer and which could be a new therapeutic target. In parallel, we identified serine residues of the SK3 channel which are important in the negative regulation of the SK3 channel by activation of the cAMP-PKA pathway.

Keywords: $\alpha 1D$ protein, CaV1.3 channel, SK3 channel, Ca^{2+} , cAMP, PKA, colon cancer cells, cell migration.

Publications

Fourbon Y, Guéguinou M, Félix R, Constantin B, Uguen A, Fromont G, Lajoie L, Magaud C, Lecomte T, Chamorey E, Chatelier A, Mignen O, Potier-Cartereau M, Chantôme A, Bois P, Vandier C. “Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity”. *Sci Rep*. 2017 Oct 27;7(1):14199. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-14230-1>

Gueguinou M, Crottès D, Chantôme A, Rapetti-Mauss R, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Girault A, **Fourbon Y**, Jézéquel P, Guérin-Charbonnel C, Fromont G, Martin P, Pellissier B, Schiappa R, Chamorey E, Mignen O, Uguen A, Borgese F, Vandier C, Soriani O. “The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca²⁺ homeostasis”. *Oncogene*. 2017 Jun 22;36(25):3640-3647. <http://doi.org/10.1038/onc.2016.501>

Berthe W., Sevrain C.M., Chantôme A., Bouchet A.M., Gueguinou M., **Fourbon Y**, Potier-Cartereau M., Haelters J.P., Gourvés H.C., Vandier C., and Jaffrés P.A. (2016). “New Disaccharide-Based Ether Lipids as SK3 Ion Channel Inhibitors.” *ChemMedChem*, 1–10. <http://doi.org/10.1002/cmdc.201600147>

Guéguinou M., Gambade A., Félix R., Chantôme A., **Fourbon Y**, Bougnoux P., Günther W., Potier-Cartereau M., Vandier C. (2015). “Lipid rafts, KCa/ClCa/ Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? ” *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1848(10), 2603–2620. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.036>

Congrès

- 11^{èmes} journées du Cancéropôle Grand Ouest (2017), Vannes. Poster.
- 13^{ème} Colloque du Réseau Produits de la mer en cancérologie et 4^{ème} colloque du réseau Canaux ioniques et cancer (2017), Maigné. Présentation orale.
- 9^{ème} Journée de Recherche de la faculté de Médecine de Tours (2016), Tours. Présentation orale.
- 14^{ème} International meeting of ECS (European Calcium Society) (2016), Valladolid. Poster.
- 29^{ème} Colloque Biotechnocentre (2016), Seillac. Poster.
- 8^{èmes} journées du Cancéropôle Grand Ouest (2015), Sables-d’Olonne. Poster.
- 28^{ème} Colloque Biotechnocentre (2015), Seillac. Poster.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	8
Abstract.....	11
Publications.....	14
Table des matières	15
Liste des tableaux	20
Liste des figures	22
Liste des abréviations.....	26
Introduction	32
I). La migration des cellules cancéreuses	33
1.1) La migration collective.....	34
1.2) La migration mésenchymateuse.....	35
1.3) La migration amiboïde.....	36
1.4) Régulation de la migration cellulaire par le Ca^{2+} cytosolique.....	37
II). Les canaux Ca^{2+} voltages dépendants : CaVs	40
2.1) Les différentes sous-unités	40
2.1.1 Les sous-unités $\alpha 1$	40
2.1.2 Les sous-unités accessoires.....	44
2.1.3 La sous-unité $\alpha 2\delta$	45
2.1.4 La sous-unité β	45
2.1.5 La sous-unité γ	45
2.2) Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques	46
2.2.1 Les canaux HVA (CaV1.X et CaV2.X).....	46
2.2.2 Les canaux LVA (CaV3.X)	47
2.3) Rôles de la protéine $\alpha 1D$ dans les cellules excitables	48
2.4) Rôles de la protéine $\alpha 1D$ dans les cellules non excitables.....	50
2.5) Rôles de la protéine $\alpha 1D$ dans les cellules cancéreuses.....	51
2.6) Fonctions non pore des CaV1.X.....	53
III). Ca^{2+}-ATPases et échangeurs Ca^{2+}	55
3.1) Les Ca^{2+} -ATPases	56
3.1.1 Les Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique (PMCA).....	56

3.1.2 Les Ca^{2+} -ATPases des réticulums endoplasmiques et sarcoplasmiques (SERCA)	58
3.1.3 Les Ca^{2+} -ATPases de la membrane golgienne (SPCA)	60
3.2) Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$	61
3.2.1 Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ (NCKX)	62
3.2.2 Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX)	64
3.2.3 Gènes et expression	64
3.2.4 Structure	64
3.2.5 Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques	65
3.2.6 Rôles dans le cancer	66
IV). Les canaux K^+ de petites conductances activés par le Ca^{2+} (SKCa) dans les cellules cancéreuses	68
4.1) Les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} : SKCa	68
4.1.1 Généralités sur les canaux K^+	68
4.1.2 Phylogénie et nomenclature	69
4.1.3 Structure des SKCa	69
4.1.4 Propriétés électrophysiologiques	71
4.1.5 Propriétés pharmacologiques	73
4.2) Rôles physiologiques des SKCa	76
4.3) Les canaux et récepteurs partenaires des SKCa	77
4.3.1 SKCa et NMDA	77
4.3.2 Couplage CaVs et SKCa	78
4.3.3 Couplage SKCa et Orai1	78
4.3.4 Interactions entre SK3 avec TRPC1, Orai1 et STIM1	79
4.4) Expression et fonctions dans les cellules cancéreuses	79
V). Régulation des canaux $\text{CaV}1.X$ et SKCa par l'AMPC : Implication dans la migration cellulaire	81
5.1) Homéostasie de l'AMPC	81
5.1.1 L'adénylate cyclase (AC)	81
5.1.2 Les phosphodiésterases (PDEs)	82
5.2) La PKA	82
5.3) Migration dépendante de la voie AMPC-PKA	84
5.4) Régulation des $\text{CaV}1.X$ par la voie AMPC-PKA	85
5.5) Régulation des SKCa par la voie AMPC-PKA	86

Matériels et méthodes	89
I). Lignées et culture cellulaire.....	90
1.1) Lignée HCT-116	90
1.2) Lignée HEK	90
II). Solutions et molécules utilisées	92
2.1) Solutions et milieux de culture cellulaire	92
2.1.1 Milieu de culture cellulaire	92
2.1.2 Phosphate Buffered saline Solution (PBS) et Trypsine-EDTA	92
2.2) Drogues utilisées	92
III). Etude de l'expression des protéines par la technique du Western-Blot.....	94
3.1) Extraction et dosage des protéines totales.....	94
3.2) Technique du Western-Blot.....	94
3.3) Révélation.....	96
3.4) Fractions protéiques des radeaux lipidiques	96
IV). Etude de la localisation de protéines d'intérêts par marquage et analyse en microscopie confocale	98
V). Biologie Moléculaire	99
5.1) Vecteurs d'expression	99
5.1.1 Préparation des plasmides	99
5.1.2 Conception des amorces	100
5.2) Mutagénèse dirigée.....	101
5.3) Amplification et purification des plasmides	102
5.3.1 Transformation bactérienne.....	102
5.3.2 Amplification bactérienne.....	102
5.3.3 Purification des plasmides	103
VI). Transfection de lignées cellulaires	104
6.1) siRNA: « Small interfering RNA »	104
6.2) Surexpression transitoire.....	104
6.3) Transfections stables	105
VII). Etudes des courants ioniques SK3 et CaV1.3 par la technique de Patch-Clamp .	106
7.1) Principe du Patch-clamp	106
7.2) Installation de Patch-clamp.....	106
7.3) Approches et configurations utilisées	107
7.4) Protocoles utilisés	108

7.5) Solutions utilisées	109
7.5.1 Solution physiologique saline (PSS)	109
7.5.2 Solutions de milieux intrapipette (MIP)	110
VIII). Migration et test de viabilité cellulaire	111
8.1) Migration cellulaire	111
8.1.1 Inserts de migration	111
8.1.2 Recouvrement cellulaire après cicatrice (wound healing)	112
8.2) Viabilité cellulaire (MTT)	112
IX). Mesure des variations de Ca²⁺ libre cytosolique.....	113
9.1) Solutions utilisées	113
9.2) Sonde Ca ²⁺ ratiométrique : Le Fura-2-AM	113
9.3) Imagerie Ca ²⁺ sur cellules adhérentes	114
X). Analyses statistiques	115
Résultats	116
Objectifs du travail.....	117
Résultats partie I	118
Résultats complémentaires et Discussion.....	169
Résultats partie II.....	176
I). Rôle de la sérine 285 dans la sensibilité du canal rSK3 à la PKA.....	177
1.1) Etudes électrophysiologiques	177
1.2) Rôle dans la migration cellulaire	180
II). Effet de la FSK + CI-1044 sur le canal hSK3	181
2.1) Etudes électrophysiologiques	181
2.2) Développement d'un canal hSK3 avec un motif d'hémagglutinine (HA)	183
2.2.1 Canal hSK3 avec le motif HA sur la boucle extracellulaire (E3) de la protéine SK3	183
2.2.2 Canal hSK3 avec un motif HA en position N-terminale	187
2.2.3 Effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale.....	189
III). Rôle des résidus sérine de la partie N-terminale de hSK3 dans la sensibilité à la FSK + CI-1044	191
3.1) Etudes électrophysiologiques du canal hSK3 HA muté S289A.....	191
3.2) Etudes électrophysiologiques du canal hSK3 HA N-terminale muté S289A-S197A-S172A-S133A	193
IV). Effet de l'Ohmline sur l'activité des canaux hSK3.....	196

4.1) Le canal hSK3	196
4.2) Le canal hSK3 HA N-terminale	197
4.3) Le canal hSK3 HA N-terminale S289-S197-S172-S133A	198
Discussion et perspectives partie II	201
Conclusions	206
Bibliographie	209
Résumé	234

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Comparaison des caractéristiques des phénotypes mésenchymateux et amiboïde dans la migration des cellules cancéreuses.</i>	37
<i>Tableau 2 : Principaux canaux Ca^{2+} et Ca^{2+} ATPases régulant la migration cellulaire dont les mécanismes d'action sur la coordination de la migration cellulaire sont connus.</i>	39
<i>Tableau 3 : Expression des différentes sous-unités $\alpha 1$ dans les cellules non cancéreuses.</i>	42
<i>Tableau 4: Expression tumorale des sous-unités $\alpha 1$ comparée aux tissus sains.</i>	43
<i>Tableau 5 : Fonctions biologiques des sous-unités $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses.</i>	44
<i>Tableau 6: Dénomination et classification des canaux CaVs.</i>	47
<i>Tableau 7 : Sélectivités pour les ions bivalents et bloqueurs trivalents des canaux CaVs.</i>	48
<i>Tableau 8 : Représentation des quatre groupes structuraux des canaux K^+.</i>	68
<i>Tableau 9 : Modulateurs de l'activité des canaux SKCa.</i>	74
<i>Tableau 10: Représentation des différentes lignées cellulaire de HEK293T utilisées.</i>	91
<i>Tableau 11 : Composition des différents tampons préparés pour l'utilisation en Western-blot.</i>	95
<i>Tableau 12 : Composition des gels d'électrophorèse lors de l'étape de migration du Western-blot.</i>	95
<i>Tableau 13 : Composition des solutions pour le fractionnement protéique.</i>	97
<i>Tableau 14 : Composition du gradient de saccharose pour le fractionnement protéique.</i>	97
<i>Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés.</i>	99
<i>Tableau 16 : Séquences des amorces des différentes constructions avec les protéines rSK3 et hSK3 des constructions utilisées.</i>	101
<i>Tableau 17 : Compositions des solutions physiologiques de PSS et de MIP utilisées en patch-clamp.</i>	110
<i>Tableau 18 : Composition de différentes solutions extracellulaires utilisées lors des mesures de la concentration en Ca^{2+} cytosolique.</i>	113
<i>Tableau 19: Récapitulatif des différences des amplitudes de courant, potentiels d'inversion mesurés ainsi que des pourcentages d'inhibition de la FSK + CI-1044 entre les courants des canaux rSK3 et hSK3.</i>	182
<i>Tableau 20: Récapitulatif des différences des amplitudes de courant, potentiels d'inversion mesurés ainsi que des pourcentages d'inhibition de la FSK + CI-1044 pour les différentes constructions du canal hSK3 avec ou sans motif HA en N-terminale.</i>	195

Tableau 21 : Récapitulatif des amplitudes de courant, potentiels d'inversion et des pourcentages d'inhibition du courant SK3 par l'Ohmline pour les différentes constructions du canal hSK3 avec ou sans motif HA en N-terminale. _____ 200

Liste des figures

<i>Figure 1 : Modes de migration cellulaire dans le contexte de la dédifférenciation épithéliale.</i>	33
<i>Figure 2 : Représentation du renouvellement des points focaux régulant la migration cellulaire.</i>	36
<i>Figure 3 : Structure de la sous-unité $\alpha 1$ formant le pore des canaux Ca^{2+} voltages dépendants.</i>	41
<i>Figure 4: Représentation phylogénétique des séquences primaires des canaux CaVs.</i>	41
<i>Figure 5 : Organisation moléculaire des différentes sous-unités des CaVs.</i>	44
<i>Figure 6 : Schéma montrant le couplage des canaux CaV1.3S fonctionnels dans les neurones de l'hippocampe.</i>	49
<i>Figure 7 : Rôle des canaux CaV1.1 et CaV1.3 dans la stabilisation des filopodes durant la migration cellulaire.</i>	53
<i>Figure 8 : Représentation schématique des différents acteurs Ca^{2+} participant à l'homéostasie Ca^{2+} dans les cellules.</i>	55
<i>Figure 9 : Mécanisme d'action des SERCAs.</i>	59
<i>Figure 10: Représentation de l'arbre phylogénétique des 147 membres composant la superfamille CaCA.</i>	62
<i>Figure 11 : Représentation schématique du modèle topologique actuel du NCKX2.</i>	63
<i>Figure 12 : Modèle de topologie des échangeurs NCX.</i>	65
<i>Figure 13: Arbre phylogénétique de la famille des canaux SKCa.</i>	69
<i>Figure 14: Structure d'un canal SKCa.</i>	70
<i>Figure 15: Schémas représentant la modélisation vue de l'extérieur d'une partie d'un canal SKCa.</i>	71
<i>Figure 16: Exemple de courants SKCa rectifiants dans le sens entrant.</i>	72
<i>Figure 17 : Schéma représentant les sites d'actions connus pour quelques modulateurs des canaux SKCa.</i>	75
<i>Figure 18 : Rôle du canal SK3 dans la migration des cellules cancéreuses du sein et de mélanomes</i>	80
<i>Figure 19 : Topologie générale de l'Adénylate cyclase.</i>	82
<i>Figure 20: Représentation schématique de la PKA et de son activation.</i>	83
<i>Figure 21: Représentation schématique de la sous-unité $\alpha 1$ du canal CaV1 avec deux sites de phosphorylation par la PKA et la PKG.</i>	86

<i>Figure 22: Sites de phosphorylation de la PKA du canal SK3 humain.</i>	88
<i>Figure 23: Morphologie des cellules HCT-116 à faible (gauche) et haute densité (droite).</i>	90
<i>Figure 24: Morphologie des cellules HEK293T à faible (gauche) et à haute densité (droite).</i>	90
<i>Figure 25: Représentation de la construction 536pPRIPu-hSK3.</i>	100
<i>Figure 26 : Schéma de l'installation de patch-clamp.</i>	107
<i>Figure 27: Représentation du protocole de rampe appliqué aux cellules HEK293T lors des expérimentations de patch-clamp.</i>	108
<i>Figure 28 : Représentation du protocole d'IV appliqué aux cellules HCT-116.</i>	109
<i>Figure 29: Représentation schématique des inserts de migration.</i>	111
<i>Figure 30 : Courants Ca²⁺ de type L obtenus sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat en configuration whole-cell de patch rompu.</i>	169
<i>Figure 31 : Expression de la partie C-terminale de la protéine CaV1.3 dans les HCT-116.</i>	171
<i>Figure 32 : Effets de ISO + CI-1044 et de FSK + CI-1044 sur la migration des HCT-116.</i>	172
<i>Figure 33 : Effets de FSK + CI-1044 sur la migration des HCT-116 dépendante des canaux CaV1.3 et SK3.</i>	173
<i>Figure 34 : Expression de la protéine α1D dans différentes lignées cancéreuses coliques.</i>	174
<i>Figure 35 : Effets du SEA0400 sur la migration des LoVo.</i>	174
<i>Figure 36 : Homologie de séquence comparée des isoformes des SKCa.</i>	177
<i>Figure 37 : Exemple de courants SK3 enregistrés sur des cellules HEK rSK3 (à gauche) et HEK rSK3 S285A muté sur la sérine 285 (à droite).</i>	178
<i>Figure 38 : Effet de FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant rSK3 S285A.</i>	178
<i>Figure 39 : Effets de FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant rSK3 et rSK3 S285A et sur la conductance membranaire.</i>	179
<i>Figure 40 : Effets de la mutation du canal rSK3 et de l'application de FSK + CI-1044 sur la migration des cellules HEK293T rSK3 et HEK293T rSK3 S285A.</i>	180
<i>Figure 41 : Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur une cellule HEK293T hSK3.</i>	181
<i>Figure 42 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant hSK3 et sur la conductance membranaire.</i>	182
<i>Figure 43 : Illustrations des constructions du canal hSK3 comportant un motif HA en position extracellulaire.</i>	183

<i>Figure 44: Exemple de l'effet de FSK+ CI-1044 sur le courant SK3 en fonction du temps.</i>	184
<i>Figure 45 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA (E3).</i>	185
<i>Figure 46 : Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA (E3).</i>	185
<i>Figure 47: Localisation membranaire de la protéine hSK3 HA (E3) dans les cellules HEK293T hSK3 HA (E3) traitées ou non avec 300 nM d'Ohmline durant 30 minutes (N = 2).</i>	186
<i>Figure 48: Exemple de l'effet du TEA sur le courant hSK3 HA (E3).</i>	186
<i>Figure 49: Exemple de l'effet de la 4-AP sur le courant hSK3 HA (E3).</i>	187
<i>Figure 50: Comparaison de la localisation membranaire des canaux hSK3 HA N-terminale et hSK3 HA E3 dans les cellules HEK293T.</i>	187
<i>Figure 51: Localisation membranaire du canal hSK3 HA N-terminale dans les cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale.</i>	188
<i>Figure 52: Exemple de l'effet de la méthyl-β-cyclodextrine sur le courant hSK3 HA N-terminale.</i>	188
<i>Figure 53 : Effets de la méthyl-β-cyclodextrine sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire de cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale.</i>	189
<i>Figure 54 : Exemple de l'effet de FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale.</i>	190
<i>Figure 55 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 de cellules HEK293 hSK3 HA N-terminale et sur la conductance membranaire.</i>	190
<i>Figure 56: Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A.</i>	191
<i>Figure 57: Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire de cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A.</i>	192
<i>Figure 58: Représentation schématique de la localisation des résidus sérines présents sur la partie N-terminale de la protéine hSK3.</i>	193
<i>Figure 59: Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.</i>	193
<i>Figure 60: Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.</i>	194
<i>Figure 61 : Exemple de l'effet de l'Ohmline sur cellule HEK293T hSK3.</i>	196

<i>Figure 62 : Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3.</i>	197
<i>Figure 63: Exemple de l'effet de l'Ohmline sur cellule HEK293T hSK3 HA N-terminale.</i>	197
<i>Figure 64 : Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 N-terminale et de la conductance membranaire.</i>	198
<i>Figure 65: Exemple de l'effet de l'Ohmline sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.</i>	199
<i>Figure 66: Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.</i>	200
<i>Figure 67 : Représentation hypothétique des mécanismes de régulation du Ca²⁺ intracellulaire favorisant la migration des cellules cancéreuses exprimant le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$.</i>	208

Liste des abréviations

α	Alpha
$\alpha 1$	Sous-unité $\alpha 1$ formant le pore des canaux CaVs
$\alpha 2$	Sous-unité accessoire des canaux CaVs $\alpha 2$
$\alpha 1C$	Sous-unité $\alpha 1C$ des canaux CaV1.2
$\alpha 1D$	Sous-unité $\alpha 1D$ des canaux CaV1.3
$\alpha 1S$	Sous-unité $\alpha 1S$ des canaux CaV1.1
AC	Adénylate Cyclase
ADN(c)	Acide Désoxyribonucléique (complémentaire)
ADP	Adénosine diphosphate
AID	Domaine d'interaction α
AF	Adhérence Focale
AKAP	Protéine kinase A d'ancrage
AKT	Protéine kinase B
5'-AMP	Acide 5'-adénylique
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
AMPC	Adénosine monophosphatecyclique
ApoCAM	ApoCalmoduline
ARN(m)	Acide Ribonucléique (messenger)
Asp	Asparagine
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATPase	Enzyme catalysant l'ATP en ADP
AT-RVD1	Médiateur lipidique de la résolvine D1 anti-inflammatoire
β	Béta
Ba ²⁺	Barium
BCL-2	Protéine pro-apoptotique
BKCa	Canal potassique sensible au calcium à forte conductance
BSA	Sérum d'Albumine Bovine
Ca ²⁺	Calcium
Ca ²⁺ -ATPase	Pompes Ca ²⁺ transportant le Ca ²⁺ par hydrolyse de l'ATP
CAF	Fibroblastes associés au cancer

CaM	Calmoduline
CaMBD	Domaine de liaison à la Calmoduline
CAMK	Protéine kinase Ca ²⁺ / Calmoduline
CaVs	Canaux Ca ²⁺ voltages dépendants
CBD	Domaine de liaison au Ca ²⁺
CCAT	Canaux Ca ²⁺ associés à la transcription
CI-1044	(R)-N-[9-amino-3, 4, 6,7-tetrahydro-4-oxo-1-phenylpyrrolo [3, 2,1-j, k] [1,4] benzodiazepin-3-yl]-3 pyridinecarboxamide
CK2	Kinase Caséine 2
Cl ⁻	Chlore
CRAC	Canaux calciques activés par la libération de Ca ²⁺
CRE	Elément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine se fixant à l'élément de réponse à l'AMPc
CVML	Cellules vasculaires de muscle lisse
CyPPA	Modulateur positif des canaux SK3
δ	Delta
DAG	Diacylglycérol
DHP	Dihydropyridine
DMEM	Milieu modifié « Dulbecco's Eagle's »
1-EBIO	Activateur des canaux SKCa et IKCa
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
EGTA	Acide éthylène Glycol tétra acétique
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
ERK	Extracellular Regulated Protein Kinase
FAK	Protéine d'adhérences focales
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance
FSK	Forskoline
γ	Gamma
Gd ³⁺	Gadolinium

GFP	Protéine de fluorescence verte
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GVIA	Canaux CaV sensibles à la toxine ω -conotoxine
HCT-116	Lignée cellulaire cancéreuse colique
HEK293T	Lignée cellulaire rénale embryonnaire
HER2	Récepteur de la famille des récepteurs aux hormones de croissance épithéliale
HGNC	Nomenclature des gènes de la base de données HUGO
hSK3	Protéine SK3 chez l'humain
HVA	Activé par de haut voltage
IC ₅₀	Concentration pour inhiber 50% de l'effet
IGF	Facteur de croissance de l'insuline
IKCa	Canal potassique sensible au calcium à conductance intermédiaire
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
IQ	Motif de liaison à la CaM (isoleucine-glutamine)
ISO	Isoprénaline
IUPHAR	Union international des bases et de la Pharmacologie clinique
IVA	Canaux CaV sensibles à la toxine ω -agatoxine
K ⁺	Potassium
KATP	Canaux K ⁺ sensibles à l'ATP
Kb	Kilobase
KBR-7943	Bloqueur pharmacologique des échangeurs Na ⁺ / Ca ²⁺
KCa	Canaux potassiques sensibles au calcium
KCl	Chlorure de potassium
kDa	KiloDalton
Kir	Canaux potassiques à rectification entrante
Kv	Canaux potassiques sensibles au voltage
K2P	Canaux potassiques à deux domaines pores
La ³⁺	Lanthane
Li ⁺	Lithium
LoVo	Lignée cellulaire cancéreuse colique

LVA	Activé par de faible voltage
MAPK	Protéine kinase induisant la mitose
MDA-MB-231	Lignée cellulaire cancéreuse mammaire
MDA-MB-435s	Lignée cellulaire cancéreuse mammaire
MDCK	Cellules rénales transformées
MEC	Matrice Extracellulaire
MCF-7	Lignée cellulaire cancéreuse mammaire
MCU	Canal Ca^{2+} mitochondrial
MEK	Protéine Kinase activée par des signaux extracellulaires/mitogènes
MET	Mésenchymato-Epithéliale Transition
Mg^{2+}	Magnésium
MLCK	Kinase des chaînes légères de myosine
Na^+	Sodium
NCX	Echangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$
NETs	Mécanisme immunitaire de piégeage des bactéries pathogènes par les neutrophiles
NETose	Mécanisme de mort cellulaire des neutrophiles polynucléaires
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T
$\text{NF}\kappa\text{B}$	Facteur kappa B nucléaire
Ni^{2+}	Nickel
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOX	NADPH oxydase
NS8593	Inhibiteur des canaux SKCa
Orai	Canal Ca^{2+}
pA	Pico Ampère
PA	Potentiel d'action
P-AKT	Protéine kinase B phosphorylée
Pb	Paire de base
Pb^{2+}	Plomb
PBS	Solution saline de tampon phosphate
PC3	Lignée cancéreuse de la prostate
PD	Domaine pore

PDE4	Phosphodiesterase de type 4
PDEC1	Nucléotides Cycliques Phosphodiesterases de type 1
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
pF	Pico Farad
PFA	Paraformaldéhyde
Pi	Phosphatidyl inositol
PI3K	Protéine phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol di-phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA2	Phospholipase A2
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMCA	Pompes ATPase Ca^{2+} membranaire
Po	Probabilité d'ouverture
PP2A	Protéine phosphatase 2A
pS	Pico Siemens
PSS	Solution physiologique saline
P2X7	Récepteur purinergique 7
Pyk2	Protéine tyrosine kinase 2
Rac 1	Petite protéine de signalisation
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
Rho A	Petite protéine de la famille Ras de liaison du GTP
rSK3	Protéine SK3 chez le rat
S285A	Mutation de la sérine 285 en une alanine
SAN	Nœud sino-auriculaire
SDS	Dodécyl-sulfate de sodium
SEA0400	Bloqueur pharmacologique spécifique des échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$
Ser	Sérine
SERCA	Pompes Ca^{2+} -ATPases des réticulums sarcoplasmique et endoplasmique

Si α 1D	Séquence d'ARN supprimant l'expression de la protéine α 1D
SiCT	Séquence complémentaire d'aucun ARNm connu utilisé en contrôle négatif
SK1/2/3	Canaux potassiques de petite conductance SKCa (SK1/SK2/SK3)
SKCa	Canal potassique sensible au calcium à faible conductance
SKF 96365	Inhibiteur des canaux TRPC et des influx SOCE
SNC	Système nerveux central
SPase	Peptide signal
SPCA	Pompe Ca ²⁺ -ATPase, voie de sécrétion du Golgi
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SOCE	Canaux ioniques activés suite à la vidange Ca ²⁺ du RE
Sr ²⁺	Strontium
Src	Protéine de stabilisation des filopodes
STIM	Protéine d'interaction stromale
STM	Segment transmembranaire
SW48	Lignée cancéreuse colique SW48
TCR	Récepteur des cellules T
TEA	Tétra-éthyl-ammonium
TEM	Transition épithélio-Mésenchymateuse
TG	Thapsigargine
TGF	Facteur de croissance transformant
TMAC	Adénylate cyclase transmembranaire
TRP	Canaux au potentiel de récepteur transitoire
TRPM	Récepteur transitoire à la mélastatine
TRPV	Récepteur transitoire au vanilloïde
UCL-1684	Inhibiteurs des canaux SKCa
UCR	Domaines notés 1 et 2 des phosphodiesterase de type 4 leurs conférant une forme courte ou longue
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial
VDCCs / VGCCs	Canaux Ca ²⁺ dépendants du voltage
VSD	Domaine de détection du voltage
VOCs	Canaux Ca ²⁺ dépendants des variations du voltage
Y ³⁺	Yttrium

Introduction

I). La migration des cellules cancéreuses

La migration cellulaire est un mécanisme essentiel aux développements de tissus et d'organes allant de la morphogénèse des tissus embryonnaires, aux renouvellements des cellules composant les tissus jusqu'aux processus de réparation. Elle permet également aux leucocytes d'être rapidement mobilisés vers le site d'infection afin d'éliminer les éléments étrangers et pathogènes de l'organisme. De plus, la migration cellulaire peut être réactivée dans des cellules normalement non mobiles comme, par exemple, les cellules épithéliales au cours de la progression tumorale. Ces cellules vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT pour « epithelial-mesenchymal transition ») : les cellules vont progressivement changer de morphologie, perdre leur polarité apico-basale, les contacts cellule-cellule, les jonctions d'adhérence et sécréter de nombreuses protéases pour dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Cette dédifférentiation, cette reprogrammation confèrent aux cellules un phénotype pro-migratoire qui leur permet d'infiltrer le tissu avoisinant, de circuler par la voie sanguine ou lymphatique et coloniser à distance de nouveaux tissus. *In vivo*, il a été montré que les cellules cancéreuses peuvent migrer collectivement ou individuellement. Lorsque les cellules migrent individuellement, elles peuvent adopter un phénotype mésenchymateux ou amiboïde. Il est en général admis que les différents modes de migration correspondent aux différentes étapes de dédifférentiation de la cellule épithéliale. La migration collective correspondrait au premier stade de dédifférentiation alors que la migration amiboïde correspondrait au stade terminal de dédifférentiation (Figure 1) (revue Gandalovičová *et al.*, 2016).

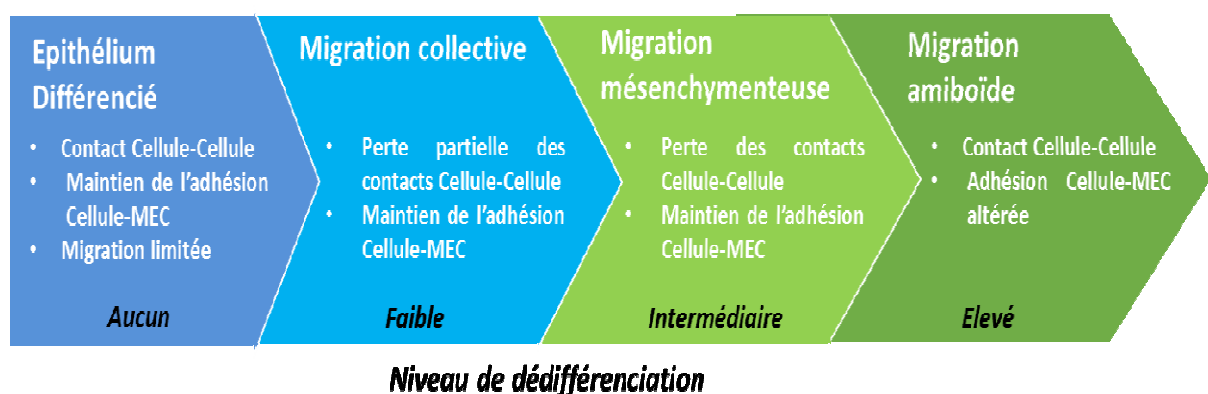


Figure 1 : **Modes de migration cellulaire dans le contexte de la dédifférentiation épithéliale.** (MEC : Matrice extracellulaire) (d'après la revue Gandalovičová *et al.*, 2016).

Il est important de noter que la TME peut-être réversible et donner suite à une MET (« mésenchymato-épithéliale transition ») car la plasticité des cellules cancéreuses fait qu'elles s'adaptent aux différentes contraintes et stimuli environnementaux qu'elles

rencontrent en engageant le type de migration le plus approprié pour rester mobiles (voir revue Pandya, 2017 ; Clark & Vignjevic, 2015). Par exemple, dans un tissu où le collagène de la MEC est sous forme de faisceaux denses et rectilignes, la migration des cellules cancéreuses observée est majoritairement de type collectif (Chanrion *et al.*, 2014). A l'inverse, les cellules isolées sont retrouvées dans les tissus où les fibres de collagène sont courtes et sinueuses. En ce qui concerne le contrôle de la migration par des stimuli environnementaux, il a été récemment montré que la migration collective est substituée par de la migration amiboïde en réponse à l'hypoxie (Lehmann *et al.*, 2017).

1.1) La migration collective

La migration collective est caractérisée par une migration coordonnée d'un ensemble de cellules maintenues entre elles par des jonctions intercellulaires et par les cadhérines. Les cadhérines semblent jouer un rôle crucial dans ce mode de migration puisque la sous- ou la sur-expression de ces dernières l'inhibe. La migration collective est le mode de migration des cellules cancéreuses le plus lent (0,01 – 0,005 $\mu\text{m}/\text{min}$) mais aurait l'avantage de protéger les cellules cancéreuses contre l'anoïkie (mort cellulaire provoquée par la perte des jonctions intercellulaires) ainsi que contre les cellules du système immunitaire en faisant « masse ». Pour migrer de façon efficace, les cellules s'organisent en entité unique ce qui implique une synchronisation ainsi qu'une polarisation collective. L'organisation « supra-cellulaire » du cytosquelette est répartie entre les différentes cellules et permet de générer un mouvement coordonné. Au front de migration, il a été observé des cellules particulières appelées « meneuses » qui guident les cellules dites « suiveuses ». Les cellules « meneuses » maintiennent un état bipolaire intrinsèque avec des protusions au niveau du front de migration orienté vers la MEC et forment des jonctions cellulaires à l'arrière avec les cellules « suiveuses ». Les « meneuses » ont un phénotype mésenchymateux (voir plus bas) ou intermédiaire (épithélial-mésenchymal). En effet, elles n'ont plus ou peu de jonctions intercellulaires, possèdent des protusions riches en actine au niveau du front de migration. De plus, elles montrent une forte capacité à dégrader la matrice extracellulaire et par conséquent à générer des « pistes » de migration pour les « suiveuses ». Des cellules « accessoires » telles que les fibroblastes associés au cancer (CAF ; cancer associated fibroblast) pourraient également prendre la place de cellules « meneuses » en remodelant la MEC (voir les revues (Gandalovičová *et al.*, 2016 ; Clark & Vignjevic, 2015)).

1.2) La migration mésenchymateuse

Les cellules cancéreuses, ayant réalisé une TEM complète, adoptent une migration de type mésenchymateuse. Elles n'ont plus besoin de contacts avec les cellules adjacentes mais maintiennent toujours un contact avec la MEC. La migration mésenchymateuse nécessite un remodelage de la matrice extracellulaire, réalisé par la sécrétion de protéases telles que des métalloprotéases ou des cathépsines pour permettre aux cellules de se frayer un chemin au travers des fibres de collagène. La vitesse de migration est relativement rapide (0,2 – 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$) par rapport à celle de la migration collective. En réponse à des signaux extracellulaires, la cellule adopte un corps cellulaire allongé et polarisé en définissant un front de migration. Des extensions membranaires (lamellipodes, filopodes) au front de migration vont se former grâce à la polymérisation d'actine, processus activé par la Rho GTPase, Rac1 (pour en savoir plus sur les différentes extensions membranaires voir la revue (Jacquemet, Hamidi, & Ivaska, 2015)).

Les protusions appelées lamellipodes vont s'étirer vers l'avant et établir des contacts focaux d'adhérence avec la MEC pour produire une force de traction. Ces points focaux sont un assemblage multimoléculaire de protéines structurales (intégrine, taline, vinculine et paxilline) qui vont faire le lien entre la MEC et le cytosquelette d'actine et de protéines de signalisation (FAK, src, Pyk2) qui régulent l'assemblage de ces points focaux. Le corps cellulaire est transloqué vers l'avant de la cellule grâce aux contractions d'actomyosines à l'arrière de la cellule qui sont contrôlées par une autre Rho GTPase, appelée RhoA. Les points focaux situés à l'arrière de la cellule vont se désassembler et se décrocher du support notamment grâce à l'action de protéases, les calpaïnes (Figure 2) (voir les revues (Friedl & Wolf, 2003; Gandalovičová *et al.*, 2016)).

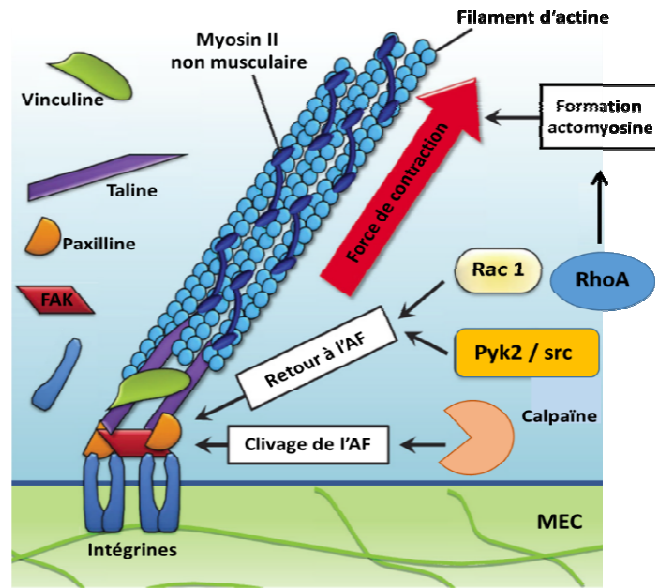


Figure 2 : **Représentation du renouvellement des points focaux régulant la migration cellulaire.** Les interactions dynamiques entre le cytosquelette, la myosine II et l'adhérence au substrat cellulaire régulent la migration. (AF : adhérence focale ; MEC : matrice extracellulaire) (d'après les revues (Friedl and Wolf, 2003 ; Chen *et al.*, 2013)).

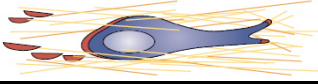

1.3) La migration amiboïde

Les cellules cancéreuses de type épithélial qui acquièrent ce mode de migration sont en général au stade le plus dédifférencié. Les cellules ont peu, voir plus de contact avec la MEC. Une diminution de l'expression des intégrines est par ailleurs observée. Le remodelage de la MEC n'est donc peu ou plus nécessaire. La cellule va se déformer et se faufiler entre les fibres de la MEC pour se déplacer. Leur déplacement peut être extrêmement rapide (jusqu'à 5µm/min) et s'effectuer de manière chaotique ou non. La migration amiboïde est caractérisée par la forme arrondie de la cellule qui est maintenue grâce à une forte contractilité cellulaire. Le mouvement amiboïde est généré par la contraction des complexes actine/myosine induite par l'activation de la RhoA. Dans la cellule amiboïde, le cortex et en particulier la myosine, maintiennent la membrane plasmique sous tension et exercent une pression hydrostatique intracellulaire pour maintenir la forme arrondie de la cellule. A un temps donné, la membrane plasmique se sépare temporairement et localement du cortex permettant au cytoplasme de s'engouffrer dans la brèche et de former une protusion sphérique nommée bleb. Le cortex se reforme ensuite à l'intérieur du bleb et entraîne sa rétractation. La tension corticale exercée par les cellules pour former un bleb est bien plus importante que celle exercée pour former un lamellipode (voir les revues (Clark & Vignjevic, 2015 ; Charras & Paluch, 2008)). Les migrations mésenchymateuses ou amiboïdes sont définies comme des migrations individuelles mais en fait, les cellules qui adoptent ces types de migration peuvent très bien

migrer collectivement et en file indienne. Les principales caractéristiques des deux types mésenchymateux et amiboïde des cellules cancéreuses sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: **Comparaison des caractéristiques des phénotypes mésenchymateux et amiboïde dans la migration des cellules cancéreuses.**

(d'après (Friedl & Wolf, 2003 ; Pankova *et al.*, 2010)).

	Migration mésenchymateuse	Migration amiboïde
		
	Phénotype mésenchymateux	Phénotype amiboïde
Morphologie	Allongée, type fibroblastique (longueur : 50 - 200 µm)	Arrondie, elliptique (longueur : 10 - 30 µm)
Vitesse de déplacement	Lente (0,1 - 1 µm / min)	Lente à Rapide (0,1 - 5 µm / min)
Attachement à la MEC	Contact et adhérence via les intégrines	Faible, à court terme, intégrines diffusées dans la membrane
Migration dans la MEC	Dégradation de la MEC Remodelage	Indépendante de la protéolyse
Interactions cellules-matrice	Intégrines et protéases focalisées	Intégrines et protéases non focalisées
Organisation du cytosquelette d'actine	Cortical Fibre de stress	Cortical
Remodelage de la matrice extracellulaire protéolytique	Présent	Non présent
Extensions de la membrane cellulaire	Filopodes et Lamellipodes	Blebs

1.4) Régulation de la migration cellulaire par le Ca²⁺ cytosolique

De nombreuses études ont montré que le Ca²⁺ cytosolique coordonne les différents mécanismes de la migration mésenchymateuse des cellules cancéreuses ou non cancéreuses (voir revues (Wei *et al.*, 2012 ; Iamshanova *et al.*, 2017)). En effet, la signalisation Ca²⁺ participe à la polarité de la cellule, au remodelage (assemblage/désassemblage) des protéines formant les points focaux, à la dynamique du cytosquelette et par conséquent aux forces de traction. Ceci s'explique par le fait que plusieurs kinases, protéases et des Rho GTPases essentielles à la machinerie cellulaire pour coordonner la migration sont dépendantes ou régulées indirectement par le Ca²⁺. Par exemple, le désassemblage des points focaux d'adhérence à l'arrière de la cellule est généré par l'action de protéases dépendantes du Ca²⁺ appelées calpaïnes (voir revue (Franco & Huttenlocher, 2005)). L'assemblage des points focaux d'adhérence à l'avant de la cellule peut être amorcé par la tyrosine kinase riche en proline, Pyk2 et la Rho GTPase Rac1 qui ont quant à elles une activité modulée par le Ca²⁺

(Lysechko *et al.*, 2010 ; Selitrennik & Lev, 2015). Le recyclage des intégrines des points focaux vers l'avant de la cellule est conditionné par l'activité phosphatase de la calcineurine qui est également dépendante du Ca^{2+} (Lawson & Maxfield, 1995). Enfin, la contraction des fibres d'actomyosines générant la force de traction de l'arrière vers l'avant de la cellule est régulée par l'activation de la protéine kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) qui est dépendante du complexe calmoduline/ Ca^{2+} et donc du Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2016). Il ne faut pas non plus perdre de vue que le Ca^{2+} peut réguler des facteurs de transcription tel que NF-FAT (nuclear-factor Activated T cells) et ainsi moduler un certain nombre de gènes impliqués dans le processus de la migration cellulaire (Quang *et al.*, 2015). Lors de la migration cellulaire mésenchymateuse, la concentration de Ca^{2+} cytosolique est finement régulée dans l'espace et dans le temps. En réponse à une molécule chimioattractante, un gradient de concentration de Ca^{2+} cytosolique est généré avec une plus forte concentration à l'arrière des cellules qu'à l'avant. La cellule se polarise et définit alors un front de migration à l'avant. L'inhibition de ce gradient de Ca^{2+} empêche la polarisation des cellules et donc leur migration (Wei *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014 ; Kim *et al.*, 2016). Au niveau du front de migration, des oscillations de Ca^{2+} , rapides et transitoires ($\sim 0,5\text{s}$) sont également observées (Wei *et al.*, 2009). Ces oscillations provoquent la rétractation des lamellipodes, l'adhérence de ces derniers à la MEC et contrôlent la direction vers laquelle la cellule se déplace (Tsai *et al.*, 2014). Le contrôle global et local (microdomaines) de la concentration de Ca^{2+} cytosolique est régulé par un système « ON and OFF ». Un système « ON » qui va permettre l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} et un système « OFF » qui va permettre sa diminution. Deux principaux mécanismes permettent l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique. Le premier est une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire selon son gradient de concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extra}} = 1-2 \text{ mM}$; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intra}} = 100 \text{ nM}$) et par des canaux Ca^{2+} dont les CaVs (voir Partie II suivante). Le second est une libération du Ca^{2+} des réserves de Ca^{2+} intracellulaire contenu majoritairement dans le réticulum endoplasmique (RE). La phase de libération du Ca^{2+} du RE est activée par la fixation de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) à son récepteur. Cette libération ne peut être que transitoire due aux réserves Ca^{2+} limitées. Ces réserves sont ensuite reconstituées à partir de l'environnement extracellulaire par l'activation de canaux Ca^{2+} (SOC pour Store Operated Channels) de la membrane plasmique. La diminution du Ca^{2+} cytosolique nécessite principalement des transports actifs de Ca^{2+} utilisant de l'ATP (Ca^{2+} ATPases) ou un gradient ionique (échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$). Les Ca^{2+} ATPases et les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) seront présentés en détail dans le chapitre III). Il est à noter que les organites intracellulaires tels que

le RE, la mitochondrie et le Golgi ont également des canaux ioniques, des Ca²⁺ ATPases et des échangeurs permettant également de réguler la concentration de Ca²⁺ du cytosol et de la lumière de ces organites. Le canal Ca²⁺ mitochondrial MCU (Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter) est un parfait exemple : il participe activement à la migration cellulaire en limitant la concentration de Ca²⁺ cytosolique (Prudent *et al.*, 2016). L'ensemble des canaux Ca²⁺/transporteurs contrôlant la migration cellulaire est présenté dans trois revues récentes (Chen *et al.*, 2016 ; Monteith *et al.*, 2017 ; Iamshanova *et al.*, 2017). Les principaux canaux Ca²⁺ connus régulant la migration cellulaire, dont les mécanismes d'action sur la coordination de la migration, sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : **Principaux canaux Ca²⁺ et Ca²⁺ ATPases régulant la migration cellulaire dont les mécanismes d'action sur la coordination de la migration cellulaire sont connus.**

*La régulation des contractions des fibres actomyosines par le canal TRPM7 n'est que partiellement dépendante de sa fonction pore. Le domaine α -kinase du TRPM7 phosphoryle la chaîne légère de la myosine II et provoque la dissociation des filaments de myosine. La formation des podosomes générée par l'activation du TRPM7 est quant à elle uniquement dépendante de l'activité kinase (Clark *et al.*, 2006).

Action sur la coordination de la migration cellulaire	Canaux	Type cellulaire	Référence
Polarité de la migration	MCU	Cancer du sein (Hs578)t	Prudent et al., 2016
	Orai/STIM1 PMCA	Cellule endothéliale (HUVEC)	Tsai et al., 2014
	TRPM7	Fibroblaste (WI-38)	Wei et al., 2009
	CaV de type L	Cellule endothéliale (HUVEC)	Kim et al., 2016
	TRPC1	Ostéosarcome (U2OS) Cellule rénale transformée (MDCK)	Huang et al., 2015 Fabian et al., 2008
Dynamisme des protusions (lamellipodes, filopodes, pseudopodes)	CaV de type L (CaV1.1 et 1.3) filopode	Cancer du sein (MDA-MB231)	Jacquemet et al., 2016
	Orai1/STIM1, pseudopode	Mélanome (WM793)	Sun et al., 2014
Dynamisme des points focaux	Orai1/STIM1	Cellules cancéreuses du sein (MDA-MB231)	Yang et al., 2009
	TRPM7	Neuroblastome (NIE-115)	Clark et al., 2006
	MCU	Cancer du sein (Hs578)t	Prudent et al., 2016
Contraction des fibres actomyosines	CaV de type L	Fibroblaste (MEF)	Yang et al., 2005
	MCU	Cancer du sein (Hs578)t	Prudent et al., 2016
	TRPM7 *	Neuroblastome (NIE-115)	Clark et al., 2006

II). Les canaux Ca^{2+} voltages dépendants : CaVs

Les canaux Ca^{2+} activés par le potentiel ont été découverts en 1953. Depuis, ces canaux ont été renommés un bon nombre de fois, en canaux VOCs (voltage-operated Ca^{2+} channels), canaux VDCCs (Voltage-Dependent Ca^{2+} Channel), canaux VGCCs (Voltage-Gated Ca^{2+} Channels) ou canaux CaVs. Cette grande famille comprend des canaux Ca^{2+} qui s'activent suite à la dépolarisation de la membrane plasmique. Ils ont été principalement étudiés dans les cellules excitables du système cardiovasculaire, dans les neurones et le muscle squelettique. Cependant, ils sont également exprimés dans des cellules non excitables comme les cellules immunes, les ostéocytes ou encore les cellules cancéreuses. Dans les cellules cancéreuses, il a été montré que ces canaux ioniques pouvaient réguler divers mécanismes tels que la migration cellulaire, l'invasion cellulaire, la résistance à la mort cellulaire ou encore le développement des métastases (Vig & Kinet, 2009 ; Buchanan, 2016).

2.1) Les différentes sous-unités

2.1.1 Les sous-unités $\alpha 1$

Les canaux CaVs, sont composés d'une sous-unité $\alpha 1$ formant le pore du canal. Cette sous-unité $\alpha 1$ est composée de 4 domaines transmembranaires (notés I à IV) dont chacun comporte 6 segments transmembranaires (S1 à S6) (Figure 3). La boucle localisée entre les segments S5 et S6 de chaque domaine transmembranaire constitue le pore et confère au canal sa sélectivité pour le Ca^{2+} . Le segment S4 de chaque domaine est chargé positivement. Il permet la détection des variations du potentiel de membrane, permettant ainsi de réguler l'activité du canal en fonction du potentiel. Ce segment est nommé « voltage sensor ». La sous-unité $\alpha 1$ possède également un site de liaison pour une sous-unité β accessoire, appelé domaine d'interaction AID (α Interaction Domain) et un site de liaison pour le Ca^{2+} avec la CaM (Calmoduline) sur son extrémité C-terminale, site nommé IQ (« IQ » en référence aux 2 premiers acides aminés du motif : isoleucine et glutamine) (Figure 3).

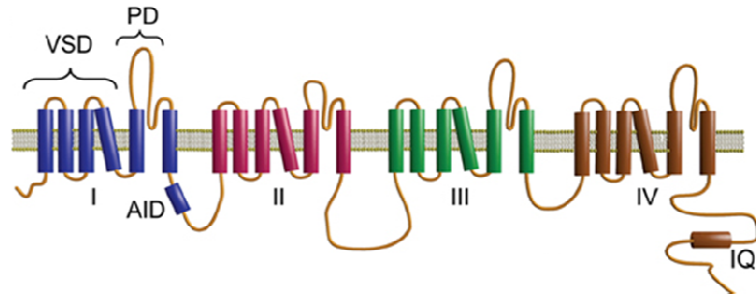


Figure 3 : **Structure de la sous-unité $\alpha 1$ formant le pore des canaux Ca^{2+} voltages dépendants.**

Homologue à la sous-unité $\alpha 1$ au canal Na^+ activé par le voltage, elle se compose de quatre répétitions (I-IV) reliées par trois boucles cytoplasmiques, à savoir les boucles I-II, II-III et III-IV. La boucle I-II contient le site de liaison hautement conservé pour la sous-unité β , appelé domaine d'interaction $\alpha 1$ ou AID. L'extrémité C-terminale est relativement grande et loge le site de liaison pour Ca^{2+} / CaM (calmoduline) (IQ). Chaque répétition contient six hélices transmembranaires qui comprennent deux domaines structuraux distincts: le domaine de détection du voltage (VSD) formé par les quatre premières hélices et le domaine pore (PD) (d'après la revue (Neely & Hidalgo, 2014)).

Le domaine I de la sous-unité $\alpha 1$ régule les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal responsable des différences de propriétés électrophysiologiques observées entre les canaux CaVs cardiaques CaV1.2 et ceux des cellules musculaires squelettiques CaV1.1 (revue Neely & Hidalgo, 2014). La diversité fonctionnelle des canaux CaVs tient en premier lieu à la multiplicité de ces sous-unités canalaires. Dix sous-unités α codées par 10 gènes distincts ont été découverts à ce jour et sont classés en trois sous-familles phylogénétiques notées : CaV1X, CaV2X et CaV3X (Catterall *et al.*, 2005 ; Alexander *et al.*, 2015). La figure 4, représente l'arbre phylogénétique permettant de situer les différentes sous-unités $\alpha 1$ au sein des sous-familles.

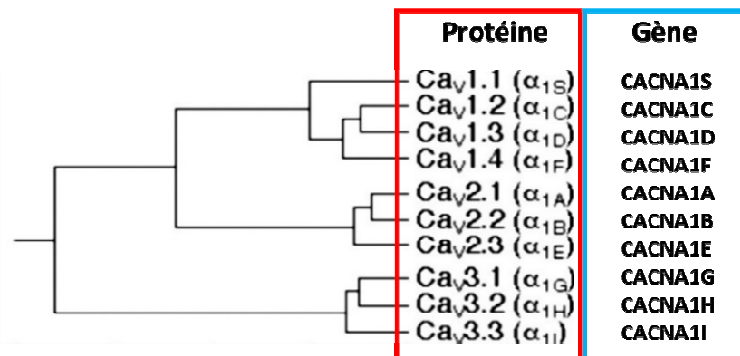


Figure 4: **Représentation phylogénétique des séquences primaires des canaux CaVs.**

(d'après le site de l'IUPHAR. Les CaVs sont classés en fonction de leur appartenance à une sous-famille d'où le terme CaVX.Y avec X et Y représentant respectivement un nombre désignant la sous-famille et un nombre désignant un membre de cette sous-famille. Au début des découvertes et des études de ces sous-unités, la dénomination a été faite en tenant compte de la localisation où ces sous-unités avaient été découvertes, comme par exemple pour les sous-unités $\alpha 1S$, muscle squelettique, ou $\alpha 1C$, système cardiaque. Puis cette dénomination a évolué sans tenir compte de cette localisation, par exemple pour des sous-unités dont l'expression est retrouvée de façon ubiquitaire dans les tissus : $\alpha 1G$ - $\alpha 1H$ - $\alpha 1I$ (International Union of Pharmacology) (Catterall *et al.*, 2005).

Chaque sous-unité $\alpha 1$ présente des propriétés fonctionnelles distinctes et une expression tissulaire précise (voir tableau 3). De plus, la plupart des gènes codant pour la sous-unité $\alpha 1$ subissent des épissages alternatifs conduisant à une diversité moléculaire remarquable (Valerie *et al.*, 2013 ; Gray, Raingo, & Lipscombe, 2007 ; Singh *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2013).

Tableau 3 : **Expression des différentes sous-unités $\alpha 1$ dans les cellules non cancéreuses.** (d'après (revue Simms and Zamponi, 2014 ; Davenport *et al.*, 2015 ; Shao *et al.*, 2005)).

Sous-unité Canalaire	Expression tissulaire
CaV1.1 ($\alpha 1S$)	Muscles squelettiques, ostéocytes
CaV1.2 ($\alpha 1C$)	Coeur, muscles lisses, neurones, cellules endothéliales, endocrines et immunitaires (lymphocyte T et B), fibroblastes, ostéocytes et ostéoblastes
CaV1.3 ($\alpha 1D$)	Neurones, cœur (sinus, oreillette), ostéocytes, cellules sensorielles (rétine, oreille interne) et épithéliales du côlon
CaV1.4 ($\alpha 1F$)	Rétine, ostéocytes, mastocytes et lymphocytes T et B
CaV2.1 ($\alpha 1A$)	Système nerveux, jonction neuromusculaire, cellules β pancréatiques
CaV2.2 ($\alpha 1B$)	Système nerveux central et périphérique (incluant nocicepteurs)
CaV2.3 ($\alpha 1E$)	Systèmes nerveux et endocrines
CaV3.1 ($\alpha 1G$)	Systèmes nerveux et endocrines, cœur, ostéoblastes
CaV3.2 ($\alpha 1H$)	Systèmes nerveux et endocrines, neurones nocicepteurs et cellules ostéocytes et ostéoblastes
CaV3.3 ($\alpha 1I$)	Système nerveux, ostéoblastes

Une étude de l'expression de ces sous-unités $\alpha 1$ dans différents types de tissus cancéreux a été réalisée par méta-analyse. Il a alors été observé que l'expression de certains ARNm codant pour ces sous-unités $\alpha 1$ était augmentée dans certains types de tissus cancéreux par rapport aux tissus non cancéreux. Ces résultats sont présentés dans le tableau 4 (Wang *et al.*, 2015). Cependant, il n'a pas été recherché systématiquement si la surexpression des ARNm était corrélée à la surexpression de la protéine et si cette dernière était active sous la forme d'un canal.

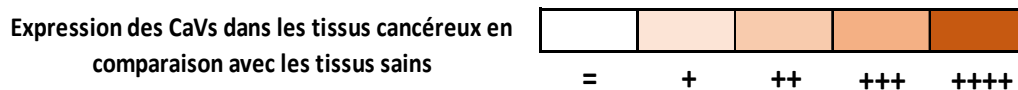
La formation d'un canal fonctionnel à la membrane plasmique dans les cellules cancéreuses a été rapportée dans des études suite à des activités canalaire mesurées par patch-clamp et par mesure du Ca^{2+} cytosolique après dépolarisation de la membrane

plasmique (CaV1.X : (Neelands *et al.*, 2000 ; Mergler *et al.*, 2005 ; Sousa *et al.*, 2013 ; Squecco *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2015)) ;(CaV2.2 : (Sousa *et al.*, 2013)) ; (CaV2.3 : (Mergler *et al.*, 2005)) ;(CaV3.X : (Lu *et al.*, 2008 ; Sousa *et al.*, 2013 ; Marques *et al.*, 2015)).

Dans d'autres études, il a été retrouvé l'expression de certaines sous-unités $\alpha 1$ et observé un rôle de ces sous-unités dans la régulation du Ca^{2+} cytosolique par l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques et de siRNA, mais sans rechercher si ces sous-unités fonctionnaient comme canaux Ca^{2+} ($\alpha 1C$: (Wang *et al.*, 2000)) ; ($\alpha 1D$: (Hao *et al.*, 2015)).

Tableau 4: Expression tumorale des sous-unités $\alpha 1$ comparée aux tissus sains. (d'après Wang *et al.*, 2015).

CaVs	Type L				P/Q	N	R	T		
	CaV1.1	CaV1.2	CaV1.3	CaV1.4	CaV2.1	CaV2.2	CaV2.3	CaV3.1	CaV3.2	CaV3.3
Gènes	CACNA1S	CACNA1C	CACNA1D	CACNA1F	CACNA1A	CACNA1B	CACNA1E	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1I
Expression tumorale	Cerveau									
	Cervical									
	Colorectal									
	Gastrique									
	Glioblastome									
	Leucémie									
	Neuroblastome									
	Oesophage									
	Ovaire									
	Pancréas									
	Peau									
	Poumons									
	Prostate									
	Rein									
	Sarcome									
	Sein									
	Synovial									
	Testicule									
	Utérus									
Vessie										



Les différentes fonctions biologiques attribuées aux sous-unités $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : **Fonctions biologiques des sous-unités $\alpha 1$ dans les cellules cancéreuses.**
(revue Buchanan, 2016).

CaVs		Type L				P/Q	N	R	T		
		1.1	1.2	1.3	1.4	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
Fonctions Biologiques	Autophagie										
	Cycle cellulaire										
	Différenciation										
	Migration										
	Non canonique										
	Progression de la croissance										
	Prolifération										
	Résistance à l'apoptose										
	Survie										
	Viabilité cellulaire										

2.1.2 Les sous-unités accessoires

L'activité ainsi que la demi-vie de ces canaux peuvent être modulées par la coexpression d'un certain nombre de sous-unités accessoires ($\alpha 2\delta$, β et γ) qui permettent de moduler la conductance et les propriétés du canal telles que leur adressage à la membrane plasmique, la régulation de leur activité ainsi que leur conductivité (Figure 5). Toutes ces sous-unités existent sous différentes isoformes (Arikkath & Campbell, 2003).

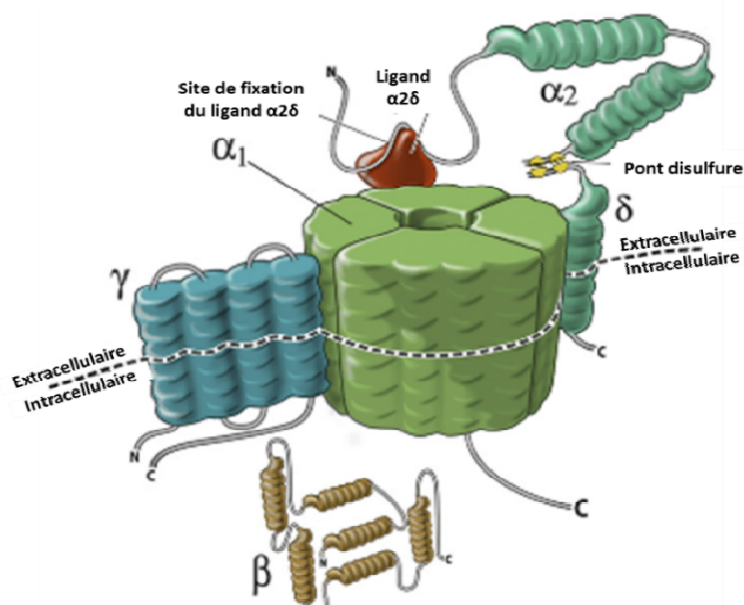


Figure 5 : **Organisation moléculaire des différentes sous-unités des CaVs.**

Les CaVs sont composés de quatre sous-unités : la sous-unité $\alpha 1$ se compose de quatre domaines homologues, chacun contenant six segments transmembranaires formant le pore du canal. La sous-unité β est intracellulaire, la sous-unité γ a quatre segments transmembranaires et la sous-unité δ a un segment transmembranaire attaché à la sous-unité $\alpha 2$ en extracellulaire via une liaison disulfure (Doan, 2010).

2.1.3 La sous-unité $\alpha 2\delta$

La sous-unité accessoire $\alpha 2\delta$, d'un poids moléculaire d'environ 175 kDa correspond au produit d'un gène qui va, au niveau post-traductionnel, être clivé en peptides $\alpha 2$ et δ liés par un pont disulfure. Il a été retrouvé quatre gènes de mammifères codant pour les sous-unités $\alpha 2\delta 1$, $\alpha 2\delta 2$, $\alpha 2\delta 3$ et $\alpha 2\delta 4$, qui sont respectivement notés *CACNA2D1*, *CACNA2D2*, *CACNA2D3* et *CACNA2D4* (Davies *et al.*, 2009 ; Davies *et al.*, 2006). La sous-unité $\alpha 2$ est extracellulaire alors que la δ est transmembranaire. La coexpression d'une sous-unité $\alpha 2\delta$ avec une sous-unité $\alpha 1$ des 2 sous familles CaV1 et CaV2 induit une augmentation de l'amplitude du courant Ca^{2+} pouvant être attribuée à une augmentation de l'adressage membranaire de la sous-unité $\alpha 1$, à une diminution du processus d'internalisation et/ou à une interaction allostérique facilitatrice sur l'activité du canal (Davies *et al.*, 2006 ; Gao *et al.*, 2000 ; Bernstein & Jones, 2007 ; Cantı *et al.*, 2005 ; Gurnett, Felix, & Campbell, 1997 ; Sandoval *et al.*, 2004).

2.1.4 La sous-unité β

La sous-unité β est une sous-unité intracellulaire d'environ 55 kDa. Il a été retrouvé quatre isoformes (notés $\beta 1-4$) codées par des gènes distincts, *CACNB1* à *CACNB4* (Yang *et al.*, 2015 ; Hofmann, 2000). Cette protéine β est fortement exprimée dans les tissus excitables comme le cerveau, le cœur et les muscles (Buraei & Yang, 2010). Elle s'associe à la sous-unité $\alpha 1$ au niveau de la boucle cytoplasmique I-II et régule les propriétés électrophysiologiques du canal telles que les cinétiques d'activation et d'inactivation (Pragnel *et al.*, 1994).

2.1.5 La sous-unité γ

Les sous-unités γ sont des protéines transmembranaires ²impliquées dans la régulation des récepteurs AMPA (amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate, récepteurs ionotropes localisés dans les synapses postsynaptiques et activés par le glutamate). Il a été identifié huit gènes *CACNG1* à *CACNG8* codant pour les sous-unités $\gamma 1$ à $\gamma 8$. Ces protéines d'environ 30 – 35kDa sont caractérisées par 4 hélices transmembranaires avec les extrémités C et N-terminales intracellulaires. Cette sous-unité γ a pour effet de décaler les courbes d'activation et d'inactivation vers les potentiels positifs, créant ainsi une diminution du courant Ca^{2+} à des potentiels physiologiques (Yang *et al.*, 2011 ; Kang *et al.*, 2011). Par exemple, il a été observé dans des myotubes de souris déficientes en $\gamma 1$ une phosphorylation des canaux CaV1.X par la PKA conduisant à une augmentation de l'amplitude du courant Ca^{2+} des CaV1.X (Held *et al.*, 2002).

2.2) Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques

La classification fonctionnelle des canaux Ca^{2+} est fondée sur des critères électrophysiologiques et pharmacologiques suite à la découverte de modulateurs et de toxines spécifiques de ces canaux. Il est possible de distinguer deux catégories de CaV en fonction des valeurs de potentiel à partir desquelles ils s'activent : la première est activée par des dépolarisations élevées et correspond aux canaux Ca^{2+} de « haut seuil », ou HVA (High-Voltage-Activated), la deuxième est activée par des dépolarisations moins élevées et correspond aux canaux Ca^{2+} de « faible/bas seuil » nommés LVA (Low-Voltage-Activated) (revue Catterall *et al.*, 2005).

2.2.1 Les canaux HVA (CaV1.X et CaV2.X)

Les canaux HVA s'activent à partir de -40 mV et présentent une inactivation lente et une plus grande conductance par rapport aux LVA. Ces canaux correspondent aux canaux Ca^{2+} de la famille CaV1.X et CaV2.X. Les CaV1.1, CaV1.2, CaV1.3 et CaV1.4 sont sensibles aux dihydropyridines (DHP), phénylalkylamines et benzothiazépines. Ils sont baptisés CaVs de type L en référence à « Long Lasting », c'est-à-dire qui dure dans le temps par rapport aux « Transient » que l'on verra après. Les sous-familles des canaux CaVs présentent des propriétés électrophysiologiques distinctes dépendantes de leur composition moléculaire. Les canaux CaV1.X s'activent typiquement à -40 mV et le potentiel pour lequel l'amplitude du courant culmine est à 0 mV. Les CaV1.X présentent une cinétique d'activation dépendante du potentiel et du temps et celle d'inactivation est dépendante en plus de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Budde, Meuth, & Pape, 2002). Ces CaV1.X sont donc sensibles aux DHPs (exemple : nifédipine avec des sites de liaisons extracellulaires), aux phénylalkylamines (exemple : vérapamil qui agit comme bloqueur de pores avec des sites de liaisons intracellulaires) et aux benzothiazépines (exemple : diltiazem) et peuvent être activés par des DHPs tels que le BayK8644. Les canaux CaV1.X présentent aussi une grande sensibilité pour certaines toxines avec lesquelles ils sont également bloqués, comme avec les toxines peptidiques natives telle que la ω -agatoxine IIIA (ω -Aga IIIA), isolée du venin de l'araignée de la trémie *Agelenopsis aperta*. Cette toxine a alors pour effet de réduire l'amplitude des courants CaV1.X, mais à l'inverse des DHPs, les cinétiques d'activation et d'inactivation ne sont pas impactées par son effet (Mintz *et al.*, 1992). Les canaux CaV2.X sont principalement retrouvés dans les neurones. Le CaV2.1 a été découvert dans les cellules de Purkinje ainsi que dans les cellules granuleuses cérébelleuses, il se divise en deux types de courant, notés P et Q,

correspondant à deux variants issus d'épissage alternatif qui se distinguent par une sensibilité différente à la ω -agatoxine (IVA). Le CaV2.2 possède une conductance intermédiaire et de par sa localisation principalement neuronale, a été appelé de type N (Fox *et al.*, 1987). Il est insensible aux DHPs mais sensible à la ω -conotoxine (GVIA). Le CaV2.3 a été découvert dans les cellules granuleuses cérébelleuses et est résistant à l'inhibition aux DHPs, comme à certaines toxines. Ces derniers ont été nommés de type R pour « Résistant ».

2.2.2 Les canaux LVA (CaV3.X)

Les autres canaux Ca^{2+} sont les LVA, ils présentent un seuil d'activation bas (plus négatif) comparé aux HVA. En effet, ils s'activent entre -80 mV et -60 mV avec une amplitude maximale du courant atteint à -20 mV et présentent une cinétique d'activation et d'inactivation plus rapide que les canaux CaV1.X (revue Catterall *et al.*, 2005). Ces canaux sont appelés canaux de type T du fait de leur activité transitoire (T pour « Transient »). Les canaux CaV3.1 sont bloqués par un peptide issu du venin du scorpion, la kurtoxine (Chuang *et al.*, 1998), par le Mibefradil, bloqueur non sélectif mais très connu de ces canaux, ainsi que par l'amiloride (Zamponi *et al.*, 2015). Ces canaux ne sont pas sensibles aux DHPs ni aux phénylalkylamines ou aux benzothiazépines ce qui permet de les différencier pharmacologiquement des HVA. La classification des canaux CaVs ainsi que leur dénomination selon leur sous-unité $\alpha 1$ est reprise dans le tableau 6.

Tableau 6: **Dénomination et classification des canaux CaVs.**

Famille	Sous-unité canalaire	Type de courant
HVA	CaV1.1 ($\alpha 1S$)	L
	CaV1.2 ($\alpha 1C$)	
	CaV1.3 ($\alpha 1D$)	
	CaV1.4 ($\alpha 1F$)	
	CaV2.1 ($\alpha 1A$)	P/Q
	CaV2.2 ($\alpha 1B$)	N
	CaV2.3 ($\alpha 1E$)	R
LVA	CaV3.1 ($\alpha 1G$)	T
	CaV3.2 ($\alpha 1H$)	
	CaV3.3 ($\alpha 1I$)	

Une autre particularité de tous les CaVs est qu'ils sont sensibles aux cations divalents et trivalents pouvant moduler leur activité. Les canaux CaVs présentent une certaine sélectivité pour les cations divalents tels que le Baryum (Ba^{2+}), le Calcium (Ca^{2+}), le Magnésium (Mg^{2+}) et le Strontium (Sr^{2+}). Aussi, le Ba^{2+} est connu pour augmenter la conductance des canaux CaVs et est utilisé couramment lors d'études électrophysiologiques

afin de faciliter la mesure des courants. Certains ions, à l'inverse, bloquent ces canaux CaVs. Les cations trivalents tels que les lanthanides, Lanthane (La^{3+}) et Gadolinium (Gd^{3+}), des métaux de transition : Yttrium (Y^{3+}) et Alcalino-terreux : le Strontium (Sr^{3+}) sont des bloqueurs des canaux CaVs. Le tableau 7, répertorie la sélectivité des canaux CaVs pour certains ions ainsi que ceux pouvant les bloquer (Huc *et al.*, 2009).

Tableau 7 : **Sélectivités pour les ions bivalents et bloqueurs trivalents des canaux CaVs.**
(d'après lesite de l'IUPHAR (International Union of Pharmacology) (Bannister, Pessah, & Beam, 2009; Mlinar & Enyeart, 1993).

	Sélectivité/Conductance	Bloqueurs
CaV1.1	$\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ [13.0 - 17.0 pS]	$\text{Cd}^{2+} / \text{La}^{3+} / \text{Gd}^{3+}$
CaV1.2	Na^{2+} [85 pS] > Li^{2+} [45 pS] > Ba^{2+} [25 pS] > Ca^{2+} [8 pS] = Sr^{2+} [8 pS]	$\text{Cd}^{2+} / \text{Pb}^{2+} / \text{Gd}^{3+}$
CaV1.3	Ba^{2+} [14,9 - 16,1 pS]	Cd^{2+}
CaV1.4	Cs^{2+} [21 pS] > Ba^{2+} [4 pS]	-
CaV2.1	Ba^{2+} [16,3 - 19,6 pS]	$\text{Ni}^{2+} / \text{Cd}^{2+}$
CaV2.2	Ba^{2+} [19 pS] > Sr^{2+} > Ca^{2+}	Pb^{2+}
CaV2.3	Ba^{2+} [21 pS] > Ca^{2+} [4 pS]	$\text{Ni}^{2+} / \text{Cd}^{2+} / \text{Pb}^{2+}$
CaV3.1	$\text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ [7,3 pS]	$\text{Ni}^{2+} / \text{La}^{3+} / \text{Gd}^{3+} / \text{Sr}^{3+} / \text{Y}^{3+}$
CaV3.2	Ca^{2+} [9,1 pS] = Ba^{2+}	
CaV3.3	Ca^{2+} [11 pS]	

La suite de cette partie du manuscrit sera focalisée sur le canal Ca^{2+} CaV1.3.

2.3) Rôles de la protéine $\alpha 1D$ dans les cellules excitables

La protéine $\alpha 1D$ du CaV1.3 est présente dans les neurones de l'hippocampe, à la membrane plasmique et est regroupée dans des zones de « clusters » d'une dizaine de canaux (Moreno *et al.*, 2016). Ces canaux CaV1.3 sont des variants d'épissage comportant une extrémité C-terminale courte de 183 acides aminés et sont nommés CaV1.3S. Le couplage fonctionnel de ces canaux CaV1.3S est favorisé par le Ca^{2+} cytosolique et implique des interactions physiques via les extrémités C-terminales du canal. Au niveau de ces « clusters » les canaux CaV1.3S sont physiquement couplés et présentent des probabilités d'ouverture plus élevées que s'ils étaient seuls et génèrent un influx de Ca^{2+} persistant et important dans le cytosol des neurones (Moreno *et al.*, 2016) (Figure 6).

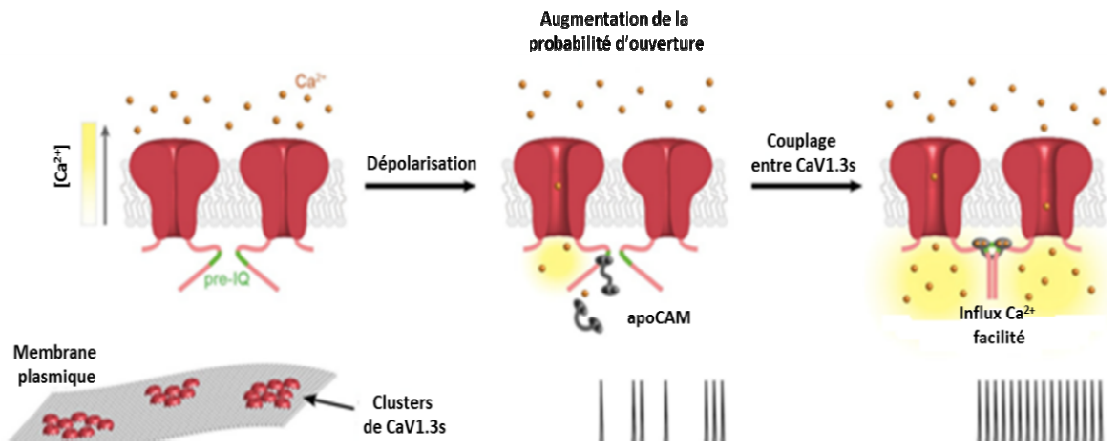


Figure 6 : Schéma montrant le couplage des canaux CaV1.3S fonctionnels dans les neurones de l'hippocampe.

Les canaux CaV1.3S sont organisés en cluster dans la membrane plasmique avec environ 8 canaux. La dépolarisation de la membrane augmente la probabilité d'ouverture des canaux CaV1.3S, ce qui fait entrer du Ca^{2+} créant ainsi des zones locales où la concentration en Ca^{2+} cytosolique est augmentée (gradient en jaune). Le Ca^{2+} se lie alors à l'apoCAM, liée au domaine pré-IQ, ce qui active la CaM favorisant ensuite les interactions entre canaux qui augmentent leurs activités, basculant ainsi dans un mode coopératif facilitant l'influx de Ca^{2+} (d'après Moreno *et al.*, 2016).

Les influx de Ca^{2+} engendrés par les canaux CaV1 peuvent activer des facteurs de transcription, tels que CREB et NFAT. Les inhibiteurs habituels des canaux CaV1 peuvent bloquer cette activation de CREB en perturbant la translocation de la CaM kinase au noyau. Son activation est dépendante du domaine IQ ancré à la CaM sur l'extrémité C-terminale du canal CaV1.3 (revue Simms & Zamponi, 2014 ; Dolmetsch *et al.*, 2001). Les canaux CaV1.3 peuvent activer CREB dans les neurones de l'hippocampe, mais seulement lors de brèves périodes d'activité neuronale. En effet, CREB peut être activé dans les neurones par 2 voies dépendantes : l'une impliquant Ras / MAPK lors de dépolarisation prolongée et l'autre impliquant la CAMK lors de brèves dépolarisations. Dans les neurones de l'hippocampe les CaV1.2 et CaV1.3 interviennent dans l'activation de CREB alors que dans les neurones striés c'est exclusivement le canal CaV1.3 (Zhang *et al.*, 2006). Les canaux CaV1.2 peuvent aussi promouvoir l'activation du facteur NFAT dans les neurones de l'hippocampe, médiée par la phosphatase dépendante du Ca^{2+} , la calcineurine (Graef *et al.*, 1999). Ce mécanisme est favorisé par les protéines d'ancrage, AKAP79/150, qui vont permettre de favoriser le ciblage des canaux par la calcineurine. Le domaine CaM/IQ du canal CaV1, avec la liaison entre son extrémité C-terminale et la calcineurine, participe à la transcription du gène favorisée par la calcineurine et le facteur de transcription NFAT (Tandan *et al.*, 2011). Le facteur CREB activé par le CaV1.3 se fait par le recrutement de la CAMKII au niveau des canaux. Le Ca^{2+} va venir se fixer sur la CaM entraînant l'activation de la CaMKII qui va alors être transloquée dans le noyau pour pouvoir phosphoryler CREB.

Dans les cellules chromaffines de la médullosurrénal, les signaux Ca^{2+} induits par les canaux CaV1.3 et CaV1.2 régulent la sécrétion de catécholamine. Il a été observé que ces deux isoformes participent directement à l'exocytose et à l'endocytose (Vandael *et al.*, 2013). Par ailleurs, la sous-unité $\alpha1D$ joue un rôle majeur au niveau de l'excitabilité cardiaque et est impliquée dans l'automatisme du nœud sino-auriculaire (SAN). En effet, chez des souris $\text{CaV1.3}^{-/-}$, il a été observé des anomalies du rythme cardiaque se traduisant par une bradycardie sinusale (Zhang *et al.*, 2002 ; Mangoni *et al.*, 2003). Le CaV1.3 régule la libération du Ca^{2+} cytosolique dans les cellules du SAN, via les récepteurs à la ryanodine du SAN (Torrente *et al.*, 2016). Aussi, cette même équipe a montré que des troubles du rythme cardiaque, telle que la bradycardie sinusale, étaient dus au manque de canaux CaV1.3 fonctionnels (Torrente *et al.*, 2016). Une autre étude chez des souris $\text{CaV1.3}^{-/-}$ a également montré que l'homéostasie Ca^{2+} était altérée et conduisait à une fibrillation auriculaire (Karnabi *et al.*, 2011 ; Mancarella *et al.*, 2008). La protéine $\alpha1D$ est également impliquée dans la sécrétion des peptides natriurétiques du cerveau (BNP : Brain natriuretic peptide), par les cardiomyocytes et est liée par couplage fonctionnel avec le canal SK4 (Srivastava *et al.*, 2016).

Par ailleurs, la sous-unité $\alpha1D$ intervient dans le processus de phagocytose des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs de la rétine est essentielle à leur renouvellement et au maintien de la vision. Le blocage de ces canaux par les dihydropyridines inhibe le mécanisme de phagocytose soulignant le rôle prépondérant du canal CaV1.3 (Müller *et al.*, 2014). Cette sous-unité $\alpha1D$ participe aussi à l'exocytose des vésicules glutamatergiques par les cellules ciliées de l'oreille interne. Le canal CaV1.3 assure le déclenchement de ce mécanisme d'exocytose en étant organisé spécifiquement dans les zones actives des synapses à ruban auditif et vestibulaire (Vincent *et al.*, 2015).

2.4) Rôles de la protéine $\alpha1D$ dans les cellules non excitables

L'expression de la protéine $\alpha1D$ est retrouvée dans le tractus intestinal, notamment dans le côlon, l'intestin grêle et le rectum et se voit inhibée dans les muqueuses du côlon suite à une inflammation. L'interféron γ serait la cytokine inflammatoire responsable de son inhibition (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Sa fonction dans le tractus intestinal est assez peu documentée mais quelques études ont démontré une participation du canal CaV1.3 dans l'absorption du Ca^{2+} au niveau de l'intestin grêle (revue Kellett, 2011).

Dans les cellules immunitaires humaines les ARNm codant pour la sous-unité $\alpha 1D$ ont été détectés dans les lymphocytes T de type Th1 et Th2, les éosinophiles, les neutrophiles mais pas dans les lymphocytes B ni dans les monocytes (Robert *et al.*, 2014). Le rôle de la sous-unité $\alpha 1D$ dans les fonctions des cellules immunes reste très flou. Chez la souris, il a été montré que la stimulation du TCR (T cell receptor) des lymphocytes T de type Th2 provoque une entrée de Ca^{2+} indispensable pour la production d'interleukine 4. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARNm anti-sens dirigés contre toutes les sous-unités $\alpha 1$ a permis de montrer le rôle primordial de ces sous-unités dans cette entrée de Ca^{2+} . Les Th2 murins co-expriment la sous-unité $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ si bien que l'on ne peut pas conclure sur le rôle exact de la sous-unité $\alpha 1D$ (Cabral *et al.*, 2010). Chez l'homme, les deux sous-unités sont également exprimées et une étude a montré que l'extinction de la sous-unité $\alpha 1C$ inhibe l'activation des Th2 par le TCR (Robert *et al.*, 2014). L'extinction de la sous-unité $\alpha 1D$ n'a pas été effectuée si bien que le rôle de cette dernière dans l'activation des Th2 n'a toujours pas été mis en évidence à ce jour. Il est également à noter que l'expression de ces sous-unités sous la forme de canal fonctionnel à la membrane plasmique n'a pas été recherchée dans ces études. Enfin, il a été observé que des canaux $CaV1.X$ contrôlent, par leur influx Ca^{2+} , la contraction des fibres d'actomyosines à l'arrière des fibroblastes et ainsi permettent la migration des fibroblastes embryonnaires en réponse au PDGF (Yang & Huang, 2005). Cependant, il n'existe actuellement aucune preuve que ce soit les canaux $CaV1.3$ qui soient impliqués dans ce mécanisme.

2.5) Rôles de la protéine $\alpha 1D$ dans les cellules cancéreuses

La sous unité $\alpha 1D$ est co exprimée avec d'autres sous-unités $\alpha 1$ dans un certain nombre de cellules cancéreuses dont les cellules neuronales de neuroblastomes et de tératocarcinomes (Grassi *et al.*, 2004 ; Neelands *et al.*, 2000). Dans ces deux études, les auteurs ont mis en évidence en patch-clamp une activité canalaire de type L, en bloquant celles de type N, P et Q par des bloqueurs pharmacologiques tels que nifédipine et ω -conotoxine, mais sans pouvoir préciser si la sous-unité $\alpha 1D$ participait au courant Ca^{2+} . L'ARNm des sous-unités $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ et $\alpha 1G$ ainsi qu'un certain nombre de sous-unités accessoires ont été détectés, dans des cellules de neuroblastome humain, les SH-SY5Y, mais le rôle de ces sous-unités n'a pas été clairement établi (Sousa *et al.*, 2013). L'utilisation de bloqueurs pharmacologiques et la dépolarisation de la membrane plasmique par application de 90 mM de KCl ont permis aux auteurs de supposer que ces sous-unités, dont celle $\alpha 1D$,

participent directement à la régulation du Ca^{2+} cytosolique dans ce type cellulaire probablement par son activité de canal.

Le gène *CACNAID*, l'ARN messenger ainsi que la protéine $\alpha 1D$ ont également été retrouvés surexprimés dans le cancer de la prostate (Wang *et al.*, 2015). Dans les cellules cancéreuses de la prostate, LNCaP, il a été observé que la 5 α -DHT (5 α -dihydrotestostérone) entraîne des variations transitoires de la concentration cytosolique de Ca^{2+} qui sont inhibées par les inhibiteurs des HVA, nifédipine, diltiazem et vérapamil (Sun *et al.*, 2006). Les auteurs n'ont pas identifié les sous-unités $\alpha 1$ touchées par ces inhibiteurs mais il est possible que la sous-unité $\alpha 1D$ joue un rôle dans la régulation du Ca^{2+} cytosolique de ces cellules mais cela reste à être confirmé. Par ailleurs, il a été observé que l'expression du gène *CACNAID* est corrélée avec un score de Gleason indiquant un cancer de la prostate agressif (Zhu *et al.*, 2015). Dans des biopsies de tumeurs ayant des scores de Gleason plus faibles, de 4 + 3 ou 8, l'expression du gène *CACNAID* est plus faible (Zhu *et al.*, 2015). Egalement dans des cultures de PC3, l'expression du gène *CACNAID* est surexprimée et l'extinction de son expression bloque significativement la prolifération et la croissance de même que l'invasion des cellules. Ces résultats sous-entendent que la progression tumorale est corrélée avec l'expression du gène *CACNAID* (Alinezhad *et al.*, 2016).

Il avait été rapporté un lien entre la mort des cellules du cancer de la prostate induite par des hormones et l'entrée de Ca^{2+} (Connor *et al.*, 1988). En effet, il a été observé que l'expression et la fonction canalaire des sous-unités $\alpha 1C$ et $\alpha 1D$ pouvaient être régulées par les œstrogènes et la testostérone (revue Buchanan, 2016). La protéine $\alpha 1D$ est surexprimée dans les carcinomes de l'endomètre en comparaison avec les tissus sains (Hao *et al.*, 2015). Son expression est augmentée par le 17 β -estradiol et l'extinction de son expression réduit l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique, médiée par le 17 β -estradiol ainsi que la prolifération et la migration des cellules Ishikawa du cancer de l'endomètre (Hao *et al.*, 2015). Ces résultats montrent que la sous-unité $\alpha 1D$ peut intervenir dans la régulation du Ca^{2+} cytosolique de ces cellules. Toutefois, le rôle de la sous-unité $\alpha 1D$ comme canal reste à être confirmé par des études complémentaires en patch-clamp ou par étude des variations du Ca^{2+} cytosolique suite à une dépolarisation de la membrane plasmique. Dans une autre étude, sur les cellules du cancer du sein, MCF-7, il a été observé en patch-clamp des courants entrants Ca^{2+} de types CaV1.X et CaV3.X, mais les auteurs n'ont pas identifié si les courants étaient dus à l'activité de la sous-unité $\alpha 1D$ (Squecco *et al.*, 2015). Aussi, l'ARNm des sous-unités $\alpha 1S$ et $\alpha 1D$ ont été retrouvés dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. L'extinction de

l'expression de ces sous-unités par des siRNA diminue le nombre de filopodes ainsi que l'invasion des cellules. Les sous-unités $\alpha 1S$ et $\alpha 1D$ participent à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 par le remodelage des filopodes (Jacquemet *et al.*, 2016). L'activité de ces protéines $\alpha 1S$ et $\alpha 1D$ comme canal n'a pas été étudié dans cette étude (patch-clamp), seuls des bloqueurs pharmacologiques et des siRNA ont été utilisés. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces sous-unités $\alpha 1S$ et $\alpha 1D$ forment des canaux Ca^{2+} favorisant la stabilité des filopodes et la formation de points focaux permettant à la cellule de migrer par adhérence et déplacement de la membrane plasmique (Figure 7) (Jacquemet *et al.*, 2016).

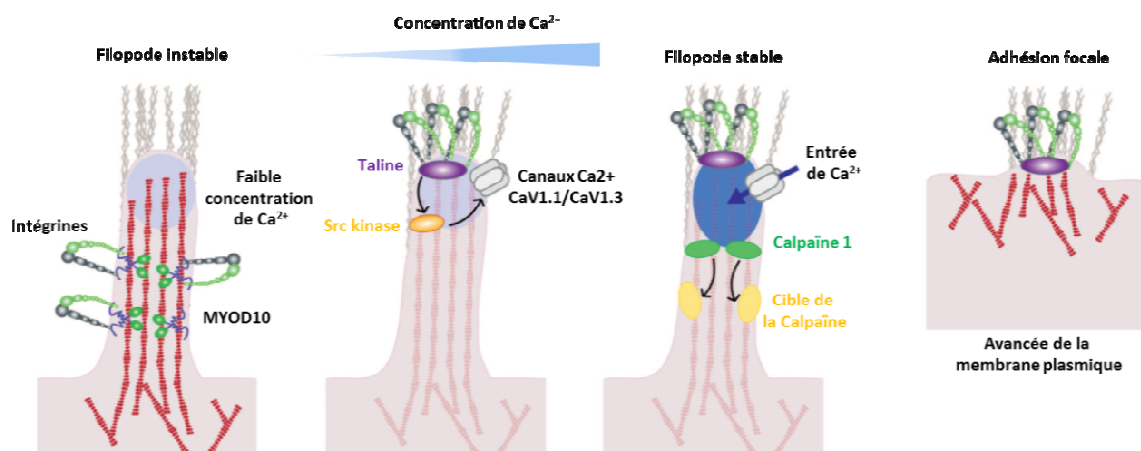


Figure 7 : Rôle des canaux CaV1.1 et CaV1.3 dans la stabilisation des filopodes durant la migration cellulaire.

Les influx de Ca^{2+} des canaux CaV1.1 et 1.3 permettent d'activer la calpaïne 1 et de stabiliser les filopodes par l'intermédiaire de la protéine kinase Src. Cette stabilisation entraîne le mouvement des cellules par la MYO10 permettant le déplacement de la membrane plasmique par l'adhérence initiée au point d'ancrage (d'après Jacquemet *et al.*, 2016).

2.6) Fonctions non pore des CaV1.X

Si la plupart des données montrent un rôle des canaux CaV1.X dans la biologie cellulaire, c'est moins clair pour les cellules cancéreuses comme nous l'avons précisé dans le paragraphe précédent. En effet, il y a peu de mesures d'activité qui ont été réalisées en patch clamp et les variations de concentration cytosolique de Ca^{2+} n'ont pas été réalisées en dépolarisant les cellules. Par ailleurs, les bloqueurs pharmacologiques des CaVs peuvent avoir un effet qui ne dépend pas du blocage des CaVs (voir discussion manuscrit Fourbon *et al.*, 2017).

Il est connu que les canaux CaVs, en plus du transport transmembranaire du Ca^{2+} via leur fonction pore, présentent également des fonctions non canoniques. En effet, la sous-unité $\alpha 1C$ (CaV1.2) comporte des régions carboxyles terminales qui peuvent être clivées. Cela

induit non seulement une modification de la sous-unité $\alpha 1$ restante mais également des fonctions dans la régulation de la transcription et ce, suite à l'adressage nucléaire de la partie C-terminale clivée (Gerhardstein *et al.*, 2000 ; Gao *et al.*, 2000). Une étude a également démontré un variant CaV1.2 exprimé par l'activation d'un promoteur exonique dans les neurones (Gomez-ospina *et al.*, 2013). Cette même équipe avait vu quelques années avant que l'extrémité C-terminale du CaV1.2 formait un facteur de transcription (Gomez-ospina *et al.*, 2006). D'autres études, sur des cellules musculaires, ont démontré, par étude biochimique, que le CaV1.2 était clivé et délivrait un fragment C-terminale. La même chose a été constatée pour le CaV1.1, par spectrométrie de masse, sur des cellules de muscle squelettique (Hulme *et al.*, 2006). Il n'est cependant pas établi que le même mécanisme puisse avoir lieu dans les cellules neuronales. Il est possible que le clivage de la protéine ou l'expression du fragment soient dépendants du type cellulaire. D'autres études, plus récentes, ont également démontré un clivage de l'extrémité C-terminale du CaV1.2 dans des cellules musculaires lisses d'artères et qui agirait comme facteur de transcription (Bannister *et al.*, 2013). La partie C-terminale du CaV1.2 comprend un facteur de transcription CCAT qui peut être exprimé indépendamment des canaux Ca^{2+} « entiers » et peut être transposé vers le noyau et agir comme facteur de transcription (revue Simms & Zamponi, 2014). Pour le CaV1.3, on ne sait pas si l'extrémité C-terminale intervient dans la régulation de gène avec un fragment issu d'un clivage du canal ou d'un variant. Il est néanmoins possible qu'il puisse s'agir comme pour le CaV1.2 d'une régulation de gène avec un fragment de l'extrémité C-terminale du CaV1.3 qui agirait comme facteur de transcription. Il a été observé que le CaV1.3 inhiberait l'expression de la chaîne légère de la myosine II nécessaire à l'adressage du canal SK2 à la membrane plasmique dans les myocytes cardiaques (Lu *et al.*, 2015). La myosine étant nécessaire aux mécanismes d'adhérence et de migration cellulaire, il est probable que le CaV1.3 régule ces mécanismes en modulant l'expression de la myosine (Lu *et al.*, 2015).

III). Ca^{2+} -ATPases et échangeurs Ca^{2+}

Une faible concentration du Ca^{2+} cytosolique est maintenue dans les cellules par différents systèmes de transport du Ca^{2+} . Parmi ces transporteurs, des échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ de même que des Ca^{2+} ATPases permettent le transport actif du Ca^{2+} cytosolique vers le milieu extracellulaire ou vers des organites intracellulaires (réticulum endoplasmique, Golgi, mitochondries, noyau). Les Ca^{2+} -ATPases possèdent des localisations cellulaires variables. Ainsi, les PMCA (Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique) sont localisées dans la membrane plasmique des cellules, les SERCA (pompes Ca^{2+} des réticulums endoplasmiques (RE) et sarcoplasmiques (RS)) sont situées dans la membrane des réticulums endoplasmiques et sarcoplasmiques et les dernières, les SPCA (Ca^{2+} -ATPases du Golgi) sont localisées sur la membrane golgienne. Ces Ca^{2+} -ATPases ainsi que les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique maintiennent une faible concentration du Ca^{2+} cytosolique des cellules (Figure 8).

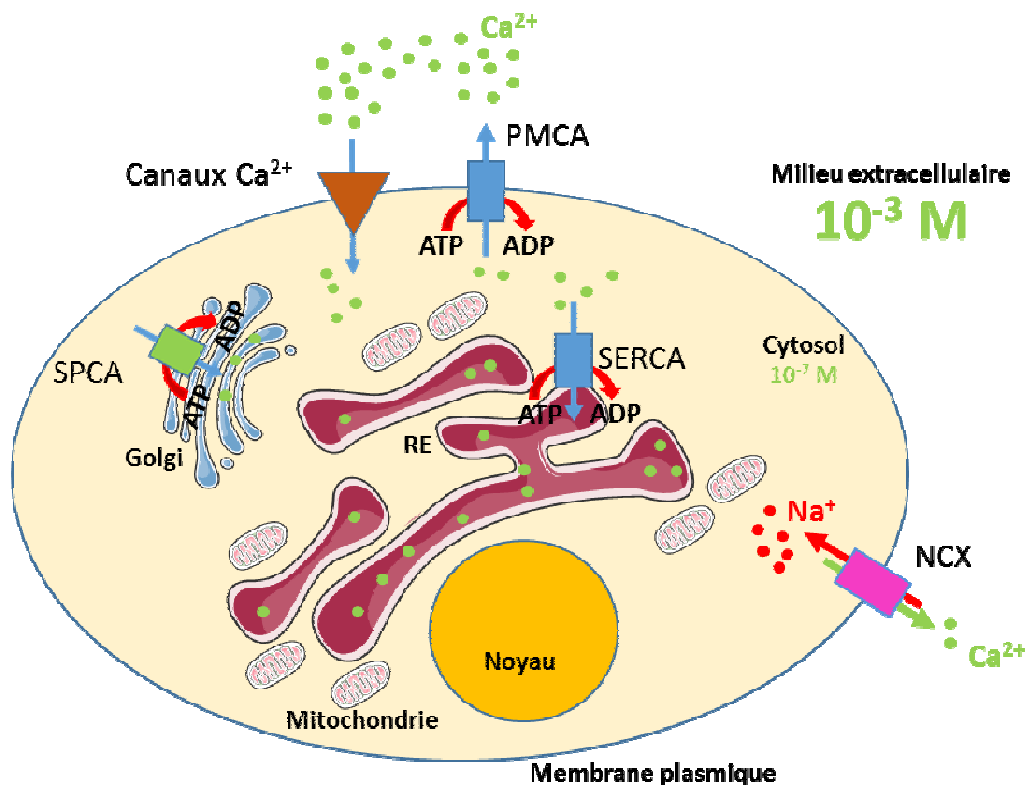


Figure 8 : Représentation schématique des différents acteurs Ca^{2+} participant à l'homéostasie Ca^{2+} dans les cellules.

(NCX : échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$; PMCA : pompe Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique ; SERCA : pompe Ca^{2+} -ATPase des réticulums endoplasmiques (RE) et sarcoplasmiques ; SPCA : pompe Ca^{2+} sécrétoire du Golgi). L'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ fonctionne en échangeant 3 ions Na^+ pour 1 ion Ca^{2+} . Il existe deux modes de fonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ avec une sortie de Ca^{2+} (mode normal) et une entrée de Ca^{2+} (mode inverse) (revues Brini & Carafoli, 2009, 2011).

3.1) Les Ca²⁺-ATPases

3.1.1 Les Ca²⁺-ATPases de la membrane plasmique (PMCA)

Les Ca²⁺-ATPases sont fonctionnelles sous forme monomérique. Elles permettent le transport du Ca²⁺ cytosolique vers le milieu extracellulaire contre son gradient électrochimique, suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La fonction principale de ces PMCA est de maintenir une faible concentration de Ca²⁺ cytosolique (vers 100 nM) par l'expulsion active du Ca²⁺ en dehors des cellules. Il s'agit d'un transport actif primaire électroneutre expulsant 1 ion Ca²⁺ par ATP hydrolysée et transportant 1 ion Ca²⁺ et 1 ion H⁺.

Les PMCA sont composées de dix segments transmembranaires avec des parties N et C-terminales cytosoliques. Deux domaines de liaison à la CaM sont situés sur la partie C-terminale conférant à ces PMCA une sensibilité au Ca²⁺ intracellulaire. Le site catalytique des PMCA est quant à lui situé sur la boucle cytoplasmique entre le 4^{ème} et le 5^{ème} segment transmembranaire. En absence de la CaM, la partie C-terminale va masquer le site catalytique laissant la pompe dans un état inactif. Lorsque la concentration en Ca²⁺ cytosolique augmente, la fixation Ca²⁺ - CaM démasque le site catalytique, en augmentant considérablement l'affinité de la pompe pour le Ca²⁺. Des protéines kinases telles que la PKA ou la PKC sont capables de réguler positivement son activité en phosphorylant des résidus sérines ou thréonines à proximité du domaine de liaison à la CaM. Il a également été observé que le clivage de la partie C-terminale par les calpaïnes rend les PMCA constitutivement actives et leurs activités deviennent indépendantes de la CaM. Enfin, des phospholipides membranaires (phosphatidylsérines) ainsi que le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) ont également été montrés comme des activateurs des PMCA (revue Lopreiato, Giacomello, & Carafoli, 2014).

Quatre isoformes humaines (PMCA1-4) codées par quatre gènes distincts (*ATP2B1-4*) ont été identifiées chez l'homme. De plus, de multiples variants (~30) qui possèdent des activités différentes ont été décrits. Par exemple, le variant α de la PMCA4 (PMCA4 α) possède une extrémité C-terminale tronquée, ce qui lui confère une activité basale plus importante (auto-inhibition moins efficace) par rapport à l'activité du variant non tronqué (PMCA4 β). Les PMCA1 et 4 sont ubiquitaires alors que l'expression de la PMCA2 et 3 est spécifique d'un tissu donné. Ces dernières sont activées plus rapidement et sont, par conséquent, mieux adaptées aux cellules excitables (revue Lopreiato, Giacomello, & Carafoli, 2014). Des études récentes révèlent un rôle important des PMCA dans la migration collective des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC). Dans les cellules

« leaders » (voir chapitre I), l'activité des PMCA's participerait au maintien du gradient de Ca^{2+} cytosolique observé lors de la migration induite par le FGF (Fibroblast Growth Factor). En effet, l'utilisation de caloxine 2A1, un inhibiteur de toutes les isoformes de PMCA's, augmente la concentration de Ca^{2+} cytosolique, inhibe la formation du gradient de Ca^{2+} ainsi que la capacité des cellules endothéliales à migrer (Tsai *et al.*, 2014). Dans cette même étude, la surexpression de la PMCA4 couplée à la GFP a permis d'observer qu'elle était majoritairement localisée au niveau du front de migration. Ceci pourrait ainsi expliquer la formation du gradient de Ca^{2+} par l'activité localisée de la PMCA4. En revanche, l'effet de la surexpression de la PMCA4 sur la migration des HUVEC n'avait pas été testé. La même année, une autre équipe a montré que la PMCA4 aurait plutôt un rôle anti-migratoire dans le même modèle cellulaire. En effet, la surexpression de la PMCA4 diminue la migration des HUVEC induite par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), alors que la délétion du gène codant pour cette PMCA dans des cellules endothéliales murines augmente leur migration. Les auteurs n'ont, par contre, pas recherché si le VEGF induisait un gradient de Ca^{2+} , ni si la surexpression ou l'extinction de la PMCA4 l'affectait. Le mécanisme d'action suggéré par les auteurs serait que la PMCA4 interagirait avec la calcineurine et inhiberait la voie de signalisation calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) (Baggott *et al.*, 2014). De futures études semblent nécessaires afin de répondre aux questions générées par ces deux études. La présence de différents variants ainsi que leur localisation membranaire différente pourraient sans doute expliquer les rôles opposés de la PMCA4 dans la migration, de même type, en technique de cicatrice (wound-healing) décrits dans ces deux études.

Peu de données sont disponibles quant aux rôles et à l'expression des PMCA's dans les cellules cancéreuses. Dans le mélanome, le variant PMCA4 β (variant long non tronqué) aurait un rôle anti-migratoire et son expression serait inhibée par la voie BRAF-MEK-Erk, voie constitutivement activée dans 60% des mélanomes (Hegedus *et al.*, 2017). Dans les tumeurs bénignes et dans les adénocarcinomes du côlon, les ARNm de la PMCA4 sont retrouvés sous-exprimés. En revanche, le rôle de cette isoforme dans les cellules cancéreuses coliques n'a pas été recherché (Aung *et al.*, 2009). A l'inverse, la PMCA2 serait surexprimée dans des lignées du cancer du sein (Lee, Roberts-thomson, & Monteith, 2005). Chez les patientes, une forte expression de PMCA2 est associée aux tumeurs de haut grade et serait de mauvais pronostic (Vanhouten *et al.*, 2010). Une étude récente montre que dans les cellules cancéreuses du sein SKBR3, la PMCA2 est associée avec le récepteur HER2 et contrôle la localisation de ce dernier au niveau des protusions riches en actine. De plus, son association

avec HER2 empêcherait l'internalisation du récepteur qui peut être déclenchée par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Jeong *et al.*, 2016). Le rôle de PMCA2 dans la prolifération et la migration de ces cellules n'a pas été recherché, mais il est possible qu'en contrôlant la localisation et l'internalisation de HER2, la PMCA2 favorise la prolifération ainsi que la migration cellulaire dépendante de HER2 (revue Appert-Collin *et al.*, 2015).

3.1.2 Les Ca^{2+} -ATPases des réticulums endoplasmiques et sarcoplasmiques (SERCAs)

Les SERCAs sont fonctionnelles sous forme monomérique. Elles permettent le transport du Ca^{2+} cytosolique vers la lumière du réticulum suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Le rendement de ces pompes est plus élevé que celle des PMCA2 car 2 ions Ca^{2+} (au lieu d'un ion Ca^{2+} pour les PMCA2) en échange de 2 ions H^+ , sont transportés pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. Ce mécanisme est par conséquent électroneutre et pourrait être responsable de l'alcalinisation des RE et RS (Yu *et al.*, 1993). Les SERCAs sont composées d'une chaîne polypeptidique unique comprenant quatre domaines majeurs (M, A, P et N). Cette chaîne est composée d'un domaine transmembranaire (M) comprenant dix hélices transmembranaires (M1-M10) et de trois domaines cytosoliques (A, P et N). Deux d'entre eux, le domaine activateur (A) et le domaine de phosphorylation (P), sont connectés au domaine transmembranaire (M). Le domaine de liaison aux nucléotides (N) est relié au domaine P (Toyoshima, 2008). Le mécanisme d'activation des SERCAs est illustré en figure 9.

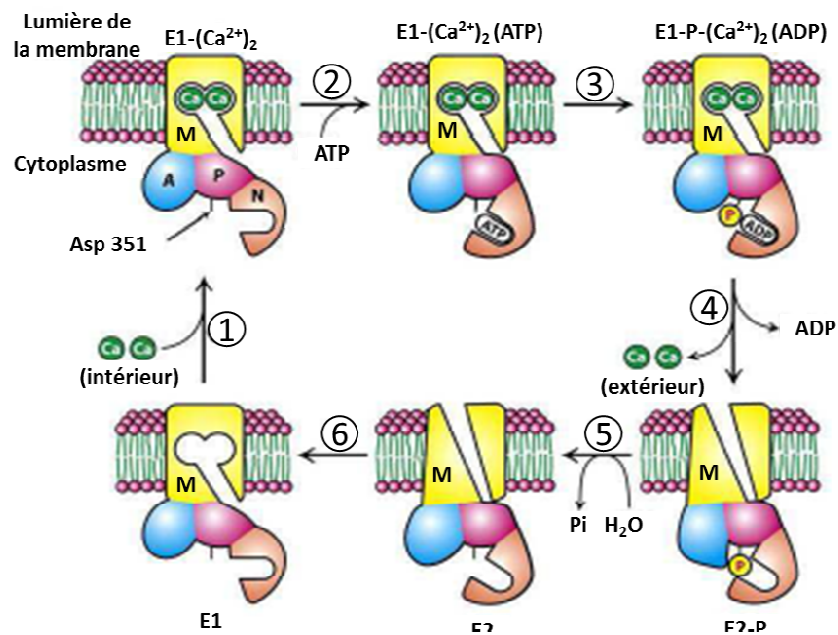


Figure 9 : **Mécanisme d'action des SERCAs.**

Représentation schématique du transport du Ca²⁺ au travers des SERCAs. (1) liaison de deux Ca²⁺ au site cytosolique de haute affinité pour le Ca²⁺ E1. (2) Fixation d'une molécule d'ATP sur le domaine N. (3) Après hydrolyse de la molécule d'ATP en ADP + Pi, la molécule de Pi libre va phosphoryler l'Asp 351 du domaine P catalytique. (4) Il s'ensuit un changement de conformation de la région cytosolique de la pompe transmis aux hélices transmembranaires, où les deux sites de liaison au Ca²⁺ ayant une affinité élevée pour le Ca²⁺ sont réarrangés pour diminuer leur affinité pour le Ca²⁺ et libérer ce dernier du côté de la lumière du RE (E2). Cette étape s'accompagne de l'élimination de l'ADP contenu sur le domaine N. (5) La déphosphorylation de l'Asp 351 permet le retour à la conformation E1 (6) (d'après Biochemistry sixth edition).

Contrairement aux PMCAs, les SERCAs ne sont pas auto-inhibées par leur domaine C-terminale. Ce sont des protéines telles que des phospholambanes (PLB) ou la sarcolipine qui s'associe aux SERCAs pour diminuer leur affinité pour le Ca²⁺. Il a été observé que la PKA pouvait phosphoryler les PLBs, réduire leur affinité pour les SERCAs et ainsi augmenter l'activité des SERCAs (Maclennan & Kranias, 2003). Chez les mammifères, il existe trois gènes, notés *ATP2A1* à *3*, codant pour trois protéines distinctes, nommées SERCA1 à 3. Les trois gènes codent jusqu'à dix isoformes par épissage alternatif. L'isoforme SERCA1 est spécifique du muscle squelettique (revue Brini & Carafoli, 2009). L'isoforme SERCA2a est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique et cardiaque où elle joue un rôle clé dans la relaxation musculaire. La SERCA2β est l'isoforme majeure exprimée dans les muscles lisses et les tissus non musculaires comme l'épiderme, où elle joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité épidermique (revue Brini & Carafoli, 2009). L'isoforme SERCA3 comprend trois variants d'épissage qui varient dans leur extrémité C-terminale. Elle est exprimée dans de nombreux tissus et est très souvent coexprimée avec la SERCA2β. La

SERCA3 est impliquée dans la relaxation du muscle lisse vasculaire, ainsi que dans la régulation de la sécrétion d'insuline via la signalisation du Ca^{2+} des cellules β pancréatiques activées par le glucose (revue Brini & Carafoli, 2009). L'expression de la SERCA2 et 3 est altérée dans certains types de cancers. Chez des patients atteints de cancers colorectaux, il a été montré que la surexpression de la SERCA2 était corrélée positivement avec le grade de la tumeur. Dans un modèle de cellules cancéreuses coliques (SW480), une surexpression de la SERCA2 augmente la prolifération et la migration des cellules alors que son extinction inhibe la prolifération et la migration cellulaire (Fan *et al.*, 2014). L'expression de la SERCA3 semble quant à elle être diminuée dans les tumeurs gastriques, du poumon ainsi que dans les leucémies myéloïdes. L'impact de cette modification d'expression n'a pas encore été étudiée (revue Cui *et al.*, 2017).

3.1.3 Les Ca^{2+} -ATPases de la membrane golgienne (SPCAs)

Les SPCAs représentent un troisième type de Ca^{2+} -ATPases. Elles sont principalement localisées dans le Golgi et ont pour rôle d'augmenter les concentrations du Ca^{2+} des compartiments cis- vers les compartiments trans-golgiens. Après une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, les SPCAs transportent le Ca^{2+} vers la lumière de l'appareil de Golgi, abaissant ainsi la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Les SPCAs possèdent une affinité pour le Ca^{2+} similaire aux SERCAs, mais ne présentent qu'un seul site de fixation au Ca^{2+} . Ces SPCAs sont également capables de transporter les ions manganèse (Mn^{2+}) dans le Golgi avec une affinité élevée. Dans le Golgi, le Ca^{2+} est nécessaire pour le trafic vésiculaire des protéines membranaires et le Mn^{2+} est impliqué dans la maturation des protéines en permettant les réactions de N- et O-glycosylation (revue Brini & Carafoli, 2009).

Chez l'homme, deux gènes codant pour les SPCAs ont été clonés : *ATP2C1* codant pour la SPCA1 et *ATP2C2* pour la SPCA2. L'expression de SPCA1 est ubiquitaire. Son niveau d'expression est particulièrement élevé dans les kératinocytes épidermiques humains. La mutation de cette isoforme est par ailleurs associée à la maladie de Hailey-Hailey, une maladie rare de la peau (Micaroni *et al.*, 2016). Une surexpression de SPCA1 est retrouvée dans les tumeurs du sein (Grice *et al.*, 2010). Cette même étude montre que l'extinction de la SPCA1 entraîne une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. De plus, son extinction empêche certaines modifications post-traductionnelles du récepteur à l'IGF (Insulin Growth Factor) réalisées dans le Golgi, qui sont indispensables pour sa fonctionnalité. Sachant que le récepteur à l'IGF est considéré comme un facteur de

mauvais pronostic dans le cancer du sein, les auteurs suggèrent que SPCA1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante. L'expression de la SPCA2 est principalement observée dans les épithéliums possédant une forte capacité de sécrétion comme ceux du poumon, du tractus intestinal, des glandes salivaires et mammaires (Vanoevelen *et al.*, 2005). Durant la lactation, l'expression de la SPCA2 est fortement augmentée et localisée majoritairement dans la lumière des cellules sécrétrices (Faddy *et al.*, 2008). Lors de la lactation, le canal Ca^{2+} Orai1 est également fortement exprimé dans ces cellules. Une étude intéressante montre que SPCA2 participe à l'adressage de Orai1 à la membrane plasmique et que l'interaction de ces deux protéines est nécessaire pour induire une forte entrée de Ca^{2+} via Orai1, indépendamment de la décharge des réserves de Ca^{2+} du RE. L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique va déclencher un influx Ca^{2+} basolatéral massif, évènement indispensable pour la sécrétion du lait (Cross *et al.*, 2014). A l'aide de différentes constructions, une étude récente suggère que la SPCA2 pourrait conserver son activité ATPasique tout en interagissant avec Orai1. La SPCA2 pourrait ainsi exercer simultanément une double fonction : stimuler un influx de Ca^{2+} via Orai1 et faire entrer du Ca^{2+} dans le Golgi (Smaardijk *et al.*, 2017). Enfin, il a été observé une surexpression de la SPCA2 dans les tumeurs du sein de type luminal (Faddy *et al.*, 2008). Dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7, la SPCA2 interagit avec Orai1 et permet une entrée constitutive de Ca^{2+} qui est corrélée avec les propriétés oncogéniques des cellules. L'extinction de Orai1 ou de la SPCA2 conduit au même phénotype : la prolifération cellulaire ainsi que la formation de tumeurs dans un modèle de souris nude sont diminuées (Feng *et al.*, 2010).

3.2) Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$

Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ font partie d'une superfamille de protéines transportant le Ca^{2+} contre son gradient de concentration (transport actif secondaire) avec le transport de Na^+ selon son gradient de concentration. Ces échangeurs prennent le relais sur les Ca^{2+} -ATPases, qui ne fonctionnent que lorsque le Ca^{2+} basal est suffisamment élevé dans le cytosol. Lors de faibles concentrations de Ca^{2+} cytosolique, les Ca^{2+} -ATPases régulent seules le Ca^{2+} . Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ font partie d'une superfamille, nommée CaCA ($\text{Ca}^{2+} / \text{anti-cations}$) comportant cinq branches majeures, avec les membres : YRBG (protéine de la membrane interne de la bactérie *Escherichia coli*), englobant essentiellement des membres bactériens ; CAX (échangeur $\text{Ca}^{2+} / \text{anion}$), comprenant principalement des échangeurs chez les végétaux et levures ; NCX (*SLC8*) et NCKX (*SLC24*), présents chez les mammifères ; CCX ($\text{Ca}^{2+} / \text{échangeur de cations}$), aussi appelé NCKX6 ou NCLX (échangeur $\text{Na}^+ - \text{Li}^+ / \text{Ca}^{2+}$). Les

membres YRBG et CAX permettent l'échange de H^+ avec le Ca^{2+} ; alors que les membres NCX et NCKX catalysent l'échange de Na^+ avec le Ca^{2+} (Lytton, 2007). Cette superfamille ainsi que ces membres sont représentés dans la figure 10 suivante :

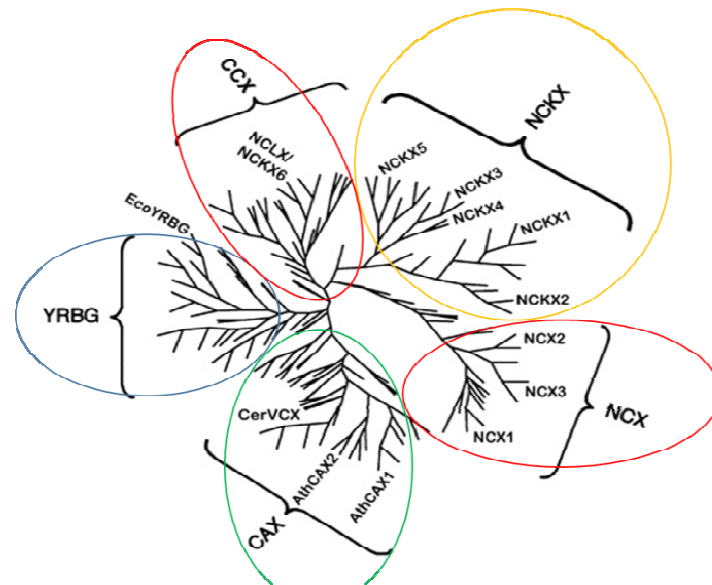


Figure 10: **Représentation de l'arbre phylogénétique des 147 membres composant la superfamille CaCA.**

Les Cinq branches principales dans l'arbre sont étiquetées et les membres représentatifs sont présentés: EcoYRBG de YRBG, est la protéine YRBG d'*Escherichiacoli* (cercle en bleu) ; CerVCX, l'échangeur vacuolaire Ca^{2+}/H^+ des CAX de *Saccharomyces cerevisiae*; AthCAX1 et AthCAX2, échangeurs Ca^{2+}/H^+ d'*Arabidopsisthaliana* (cercle en vert) ; NCX1, NCX2 et NCX3, échangeurs Na^+/Ca^{2+} et l'isoforme particulière NCLX de CCX chez *Homo sapiens* (cercle en rouge) ; NCKX1, NCKX2, NCKX3, NCKX4 et NCKX5, échangeurs $Na^+ / Ca^{2+} - K^+$ chez *Homo sapiens* (cercle en jaune) (d'après la revue Lytton, 2007).

Dans les conditions physiologiques, la principale fonction des échangeurs de Na^+ / Ca^{2+} consiste à transporter le Ca^{2+} hors du cytosol. Le fonctionnement de ces échangeurs est cependant bidirectionnel pour le Ca^{2+} ; par conséquent les échangeurs de Na^+ / Ca^{2+} peuvent également permettre l'entrée du Ca^{2+} dans le cytosol.

Pour la suite du manuscrit, je ne développerai que les échangeurs Na^+ / Ca^{2+} chez l'homme et plus particulièrement sur l'échangeur NCX, que j'ai étudié pendant ma thèse et sur son rôle dans la régulation de la concentration du Ca^{2+} cytosolique.

3.2.1 Les échangeurs $Na^+ / Ca^{2+} - K^+$ (NCKX)

Le gène *SLC24* code pour la famille d'échangeur $Na^+ / Ca^{2+} - K^+$ (NCKX). Cette famille transporte un ion K^+ et un ion Ca^{2+} en échange de quatre ions Na^+ . Elle comprend cinq membres : notés respectivement NCKX1 (*SLC24A1*), NCKX2 (*SLC24A2*), NCKX3 (*SLC24A3*), NCKX4 (*SLC24A4*), NCKX5 (*SLC24A5*) (Altimimi & Schnetkamp, 2007). L'échangeur NCKX a été découvert dans les cellules en bâtonnet de la rétine de bovin en

1999 (Haug-Collet *et al.*, 1999). Cette protéine, constituée de 1216 acides aminés, est responsable de la régulation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique libre des cellules de la rétine. Ces échangeurs NCKX comportent dix segments transmembranaires, avec des extrémités N et C-terminales présentes du côté extracellulaire. Les domaines comportant les segments 1 à 5 et ceux contenant les segments 6 à 10 sont séparés par une large boucle intracellulaire. Il y a également une boucle extracellulaire près du segment 1 qui contient le site de glycosylation, ainsi que le site de clivage du peptide signal (SPase). Il y a également deux zones de sites hautement conservés dans les domaines entre les segments 2 et 3 et les segments 7 et 8, nommés respectivement $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Figure 11) (Schnetkamp *et al.*, 2014).

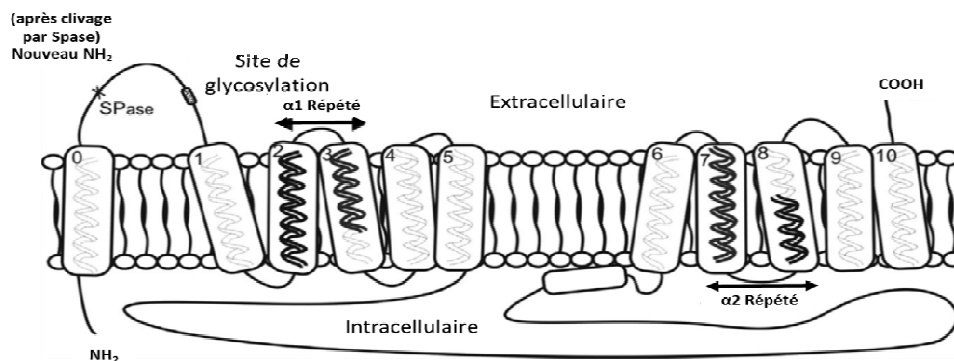


Figure 11 : **Représentation schématique du modèle topologique actuel du NCKX2.**

Le modèle actuel de structure de NCKX se compose de deux ensembles de cinq segments transmembranaires (STM) séparés par une grande boucle intracellulaire et précédés d'une boucle extracellulaire. La boucle extracellulaire contient un site de N-glycosylation ainsi que le site de clivage du peptide signal (SPase). Le STM contient les zones hautement conservées dans STM 2-3 et STM 7-8 connues sous le nom de répétitions $\alpha 1$ et $\alpha 2$ respectivement (représentées par les hélices sombres) (d'après Schnetkamp *et al.*, 2014).

L'isoforme NCKX1 est principalement exprimée dans l'œil. L'expression du NCKX2 est abondante dans les neurones du SNC, avec des niveaux élevés dans les couches corticales plus profondes, les cellules pyramidales de l'hippocampe et dans le cervelet. Cette isoforme NCKX2 est également exprimée dans les cellules ganglionnaires de la rétine et dans les cellules en cône photoréceptrices. Les isoformes NCKX3 et NCKX4 ont été retrouvées fortement exprimées dans le cerveau, en particulier dans le cortex et le thalamus. Le NCKX5 est très abondant dans l'œil et la peau, mais il est aussi exprimé dans le cerveau et le thymus. Le NCKX extrude le Ca^{2+} après une augmentation du Ca^{2+} cytosolique libre dans les cellules qui est liée à l'ouverture de canaux Ca^{2+} activés par le GMPc. (revue Lytton, 2007). L'échange de Na^+ contre le Ca^{2+} est dépendant également du transport de K^+ (Schnetkamp *et al.*, 2014). Par exemple, dans les segments externes des photorécepteurs de la rétine, il a été vu que l'échange de Na^+ et Ca^{2+} nécessite du K^+ avec une stœchiométrie de 4 Na^+ contre 1 Ca^{2+} et 1 K^+ (Schnetkamp *et al.*, 2014).

3.2.2 Les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX)

L'échangeur NCX ($\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$) permet le passage du Ca^{2+} contre son gradient de concentration, en utilisant le gradient électrochimique du Na^+ . En parallèle, les concentrations en Na^+ et Ca^{2+} cytoplasmiques régulent l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (revue Khananshvili, 2013). Le fonctionnement de l'échangeur NCX est totalement réversible et la direction du mouvement des ions transportés dépend à la fois des gradients électrochimiques du Na^+ et du Ca^{2+} , du nombre d'ions qui se lient à la protéine et du potentiel de membrane (revue Monteith *et al.*, 2017).

3.2.3 Gènes et expression

La famille des échangeurs NCX est codée par le gène *SLC8*. Il existe chez les mammifères trois isoformes de l'échangeur : NCX1, NCX2 et NCX3 codés respectivement par *SLC8A1*, *SCL8A2* et *SLC8A3*. Un quatrième membre, n'appartenant pas au génome des mammifères, a été découvert ; il s'agit du NCX4, codé par le gène *SLC8A4*, trouvé chez le poisson zebrafish, les téléostéens, ainsi que dans les génomes des reptiles et des amphibiens (revue Khananshvili, 2013). L'échangeur NCX1 a été largement étudié et a été cloné dans le cœur. Il est exprimé de façon ubiquitaire et avec abondance dans le cœur, le cerveau et le rein (Quednau *et al.*, 2004). L'expression des échangeurs NCX2 et NCX3 est plus restreinte : NCX2 est surtout abondant dans les neurones du SNC, NCX3 est exprimé principalement dans le muscle squelettique (Papa *et al.*, 2003). Les protéines NCX présentent une variété de rôles, selon leur localisation. Les NCX régulent le couplage excitation-contraction cardiaque, ainsi que la signalisation neuronale et la réabsorption du Ca^{2+} par les reins. Le NCX, localisé à la membrane plasmique, est également retrouvé dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, où il participe à l'entrée du Ca^{2+} dans le nucléoplasme (Xie *et al.*, 2002). Un échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, NCXL, codé par le gène *SLC8B1*, a aussi été retrouvé dans les membranes internes des mitochondries permettant ainsi de générer des efflux de Ca^{2+} vers le cytosol. Cet échangeur unique possède la particularité de transporter du Ca^{2+} contre du Na^+ ou du Li^+ (Palty *et al.*, 2009).

3.2.4 Structure

L'échangeur NCX présente neuf segments transmembranaires séparés en deux entités avec une partie amino-terminale composée des cinq premiers domaines transmembranaires et une partie carboxy-terminale composée des quatre derniers domaines transmembranaires (Figure 12). Une large boucle intracellulaire est présente entre le segment 5 et le segment 6 et

possède différents sites de régulation et de fixation du Ca^{2+} , appelés sites CBD1 et CBD2 (Domaine de liaison au Ca^{2+}) (Figure 11). Cette boucle est constituée de près de 500 résidus et contient les sites de régulation, par liaison des ions Ca^{2+} aux sites situés dans la boucle cytosolique des domaines CBD1 et CBD2 activant l'échangeur. Le cinquième segment transmembranaire présente une séquence particulière XIP (peptide inhibiteur d'échangeur) qui peut lier un peptide bloquant le NCX (revue Brini & Carafoli, 2011).

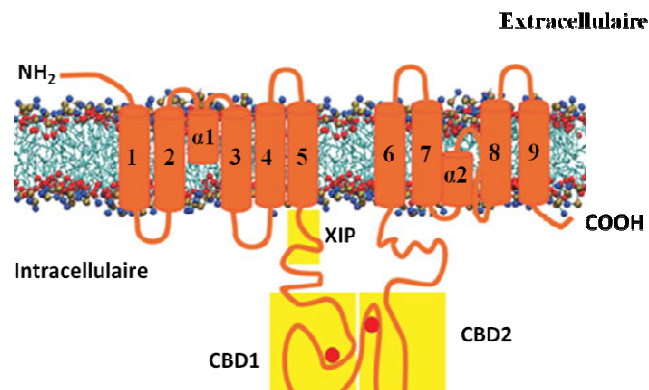


Figure 12 : **Modèle de topologie des échangeurs NCX.**

Les neuf domaines transmembranaires comprennent les deux régions de répétition putatives: $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Les régions XIP, CBD1 et CBD2 sont indiquées par des rectangles en jaune. Les ronds rouges indiquent la position des sites de liaison Ca^{2+} activant l'échangeur NCX (d'après la revue Brini & Carafoli, 2011).

3.2.5 Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques

Le NCX, contrairement aux PMCA, présente une faible affinité pour le Ca^{2+} et une grande capacité de transport pour le Ca^{2+} . Il ne consomme pas d'ATP mais permet l'échange d'un ion Ca^{2+} contre trois ions Na^+ générant ainsi un courant entrant de Na^+ . Cependant, il peut fonctionner dans l'autre sens selon le gradient électrochimique des deux ions et le potentiel de membrane. L'échangeur peut ainsi faire entrer du Na^+ et sortir du Ca^{2+} (mode normal qui induit une dépolarisation) ou bien faire entrer du Ca^{2+} et sortir du Na^+ , (mode inverse qui induit une hyperpolarisation) (revue Lytton, 2007). Des peptides peuvent se fixer sur le site XIP et venir bloquer les trois isoformes des échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (revue Khananshvili, 2013). Egalement, cette partie de la grande boucle cytosolique est responsable de la régulation du NCX par le Na^+ et par les phospholipides acides. La deuxième partie de la boucle contient les deux domaines de liaison Ca^{2+} (CBD1 et CBD2). Le CBD1 est le principal capteur de Ca^{2+} et détecte de petites augmentations du Ca^{2+} cytosolique activant l'échangeur. La CBD2 subit des modifications structurelles modérées et lie le Ca^{2+} uniquement pour des concentrations de Ca^{2+} élevées (Hilge *et al.*, 2006 ; Nicoll *et al.*, 2006). Des études ont montré que les ions Mg^{2+} entrent en compétition avec les ions Ca^{2+} pour les sites CBD1 et CBD2

(Ottolia, Philipson, & John, 2004). Les analogues à l'amiloride ou au bepridil et les dérivés d'isothiourée (KBR-7943) sont des inhibiteurs non sélectifs des échangeurs NCX. Le composé SEA0400 a été décrit comme étant un bloqueur des NCX avec une très forte capacité d'inhibition de son activité (Matsuda *et al.*, 2001). Une étude a cependant montré que les KBR-7943 et SEA0400 restent efficaces sur des souris knock-out pour *SLC8A1* (Reuter *et al.*, 2002). Des dérivés de ces composés tels que de l'ethoxyaniline, de la quinazolinone ou de l'imidazoline ont été synthétisés mais ces bloqueurs de NCX n'ont pas montré de réelles spécificités pour ces échangeurs. Développés récemment, les composés SN-6 et YM-244769 n'ont pas montré de sélectivité vis-à-vis des isoformes des échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (revue Khananshvili, 2013).

3.2.6 Rôles dans le cancer

Des études ont révélé que l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique par l'échangeur NCX était nécessaire pour l'activation et l'adressage à la membrane plasmique de la PKC α des cellules endothéliales. Cette étape est essentielle pour la phosphorylation par ERK1/2 induite par le VEGF et l'angiogénèse (Andrikopoulos *et al.*, 2011 ; 2015). L'activité des NCX en mode inverse est nécessaire pour l'activation de la voie ERK1/2 dans les fibroblastes cardiaques (Kamimura *et al.*, 2012) ainsi que dans les cellules de neuroblastomes (Nashida *et al.*, 2011). Il a également été observé que cet échangeur pouvait activer la voie ERK1/2 en aval de la thrombine et des facteurs de croissance, tels que les angiopoïétines impliquées dans l'angiogénèse tumorale (Abdel-malak *et al.*, 2007).

Un étude a montré que le OSW-1 (3, 16,17-Trihydroxycholest-5-en-22-one 16-O-(2-O-4-methoxybenzoyl-D-xylopyranosyl)-(1→3)-2-O-acetyl-L-arabinopyranoside) est un produit naturel anti-tumoral puissant qui permet de bloquer la prolifération et d'induire la mort de cellules cancéreuses de leucémie en agissant sur l'échangeur NCX1 (Garcia-prieto *et al.*, 2013).

Les NCX1 et 3 sont surexprimés dans les cellules de carcinomes de l'ovaire (Pelzl *et al.*, 2015). Les isoformes de NCX sont également surexprimées dans les cellules de glioblastomes en comparaison avec les astrocytes (Song *et al.*, 2014). Un inhibiteur des canaux TRPC et des influx SOCE, le SKF 96365 (1-[2-(4-methoxyphenyl)-2-[3-(4-methoxyphenyl) propoxy]ethyl-1H-imidazole hydrochloride), induit la diminution de la croissance des cellules cancéreuses de glioblastomes en bloquant leur cycle cellulaire par activation de la voie MAPK. Le SKF 96365 augmente la concentration de Ca^{2+} cytosolique via l'action de l'échangeur NCX en mode inverse (Song *et al.*, 2014). Le SKF 96365 peut

dépolariser la membrane des cellules musculaires lisses (revue Annunziato, Pignataro, & Renzo, 2004 ; Hotta *et al.*, 2005) suggérant que cette molécule forcerait l'échangeur NCX à fonctionner en mode inverse en dépolarisant la membrane plasmique. La transfection de l'isoforme NCX1.7 dans des cellules de gliosarcomes a montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la protéine et la viabilité ainsi que la prolifération cellulaire (Nguidjoe & Herchuelz, 2007). En effet, une surexpression du NCX1.7 entraînait la mort cellulaire par apoptose, en vidant les réserves de Ca^{2+} du RE par extrusion massive du Ca^{2+} du cytosol, par fonctionnement en mode normal de l'échangeur. Il a également été observé que la surexpression de l'échangeur réduit l'expression de Bcl-2, favorisant ainsi le processus apoptotique dans ce modèle cellulaire (Nguidjoe & Herchuelz, 2007). A l'inverse, la diminution de l'expression du NCX3 induisait l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose démontrant un rôle « protecteur » du NCX3 dans la survie des cellules de médulloblastomes (Pelzl *et al.*, 2017). A noter cependant, que dans cette étude l'échangeur NCX3 fonctionne dans son mode inverse. On peut donc supposer un rôle pro-apoptotique de l'échangeur NCX1.7 lorsqu'il fonctionne en diminuant le Ca^{2+} cytosolique et un rôle anti-apoptotique de l'échangeur NCX3 dans son mode inverse. Par ailleurs, le mode inverse de l'échangeur est primordiale pour l'activation dans le cancer de voie de signalisation telles que ERK1/2 (neuroblastomes) (Nashida *et al.*, 2011) et MAPK (glioblastomes) où l'activation est corrélée avec l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique (Song *et al.*, 2014).

IV). Les canaux K⁺ de petites conductances activés par le Ca²⁺ (SKCa) dans les cellules cancéreuses

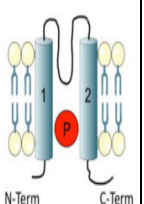
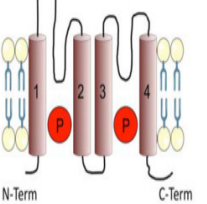
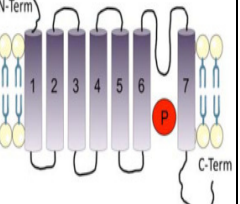
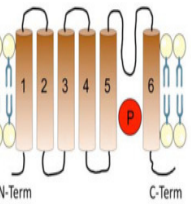
4.1) Les canaux K⁺ activés par le Ca²⁺ : SKCa

4.1.1 Généralités sur les canaux K⁺

Les canaux K⁺ sont les représentants les plus variés et nombreux de la famille des canaux ioniques. Répartis dans l'ensemble de l'organisme, ils participent à la régulation de très nombreuses fonctions. Ils sont responsables, par exemple, de l'excitabilité des cellules nerveuses capables de générer un potentiel d'action. Dans les cellules dites « non excitables », ils vont intervenir dans les phénomènes d'homéostasie K⁺, ainsi que dans le contrôle du potentiel membranaire et du volume cellulaire, ou même encore dans la sécrétion de différents composés. Au niveau structural, les canaux K⁺ ont été regroupés en une superfamille définie, d'une part, par l'homologie d'une grande partie de leur séquence en acides aminés et, d'autre part, par la présence d'un motif hautement conservé formant le pore du canal. Ce motif participe à la formation du filtre de sélectivité permettant la reconnaissance très précise d'un ion K⁺. En fonction de l'homologie de séquence en acides aminés des différentes sous-unités, la famille des canaux K⁺ a été divisée en quatre groupes qui sont représentés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : **Représentation des quatre groupes structuraux des canaux K⁺.**

Les numéros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sont les numéros des segments transmembranaires ; P, le domaine pore (d'après Gutman *et al.*, 2003)

	KATP / GIRK	2 domaines pore et 4 TM	BKCa (MaxiKCa)	Kv / IKCa / KCa
segments transmembranaires	2	4	7	6
Domaine pore	1	2	1	1
Formation du pore (entre les domaines)	1 et 2	1 et 2/3 et 4	6 et 7	5 et 6
N-terminal	cytoplasmique	cytoplasmique	extracellulaire	cytoplasmique
C-terminal	cytoplasmique	cytoplasmique	cytoplasmique	cytoplasmique
Agencement canal fonctionnel	Tétramères	Dimères	Tétramères	Tétramères
Représentation				

Parmi ces quatre groupes, il est retrouvé le groupe de canaux à deux domaines pores, qui sont agencés en dimères. Ces groupes comprennent deux domaines pores et quatre segments transmembranaires. Les autres groupes forment des canaux fonctionnels sous forme de tétramères et ne disposent que d'un seul domaine pore. Ils se distinguent respectivement de par leur sensibilité à l'ATP (KATP), au voltage (Kv), ou au Ca^{2+} (KCa). Les KCa possèdent différentes conductances avec les canaux de grande conductance (BKCa, B pour « Big »), ceux de conductance intermédiaire (IKCa, I pour « intermediate ») et ceux de petite conductance (SKCa, S pour « Small »). Ces canaux présentent en effet une conductance de l'ordre de 250 à 300 pS pour le BKCa, contre de 20 à 60 pS pour les IKCa et de 5 à 20 pS pour les canaux SKCa. Ces derniers ont été clonés en 1996 où trois différents gènes codant les protéines des canaux SKCa ont été recensés et ces protéines sont nommées SK1, SK2 et SK3 (Köhler *et al.*, 1996).

Pour la suite du manuscrit, je présenterai uniquement les canaux SKCa que j'ai étudiés lors de ma thèse.

4.1.2 Phylogénie et nomenclature

Les dénominations actuelles utilisées pour définir ces canaux sont basées sur les nomenclatures officielles de l'IUPHAR et du HGNC (<http://www.genenames.org/>). Chez l'homme, les trois gènes codant pour les trois protéines SKCa, sont situés sur des chromosomes différents : le gène *KCNN1* (gène codant pour la protéine SK1) est situé sur le locus 19p13.1 ; celui du gène *KCNN2* (pour SK2) sur le locus 5q22.3 et enfin le gène *KCNN3* (pour SK3) sur le locus 1q21.3 (Figure 13).

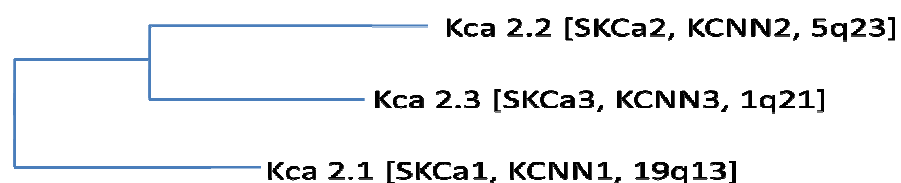


Figure 13: **Arbre phylogénétique de la famille des canaux SKCa.**
[Protéine, Gène, Locus] (d'après Gutman *et al.*, 2003).

Il existe des épissages alternatifs des exons des gènes *KCNN1* à 3, respectivement 9 exons pour *KCNN1* et 8 pour les gènes *KCNN2* et *KCNN3* (Köhler *et al.*, 1996 ; Wei *et al.*, 2005).

4.1.3 Structure des SKCa

Les canaux SKCa sont composés de quatre sous-unités α , constituées chacune de six segments transmembranaires (notée S1 à S6) ainsi que de deux extrémités C et N-terminales

intracellulaires (Figure 14). Les boucles des quatre sous-unités α , entre les segments 5 et 6 s'ancrent dans la membrane plasmique pour former le pore du canal (Weatherall *et al.*, 2010). Les canaux SKCa ont gardé une structure très conservée au cours de l'évolution, ainsi les protéines SK1, SK2 et SK3 montrent près de 80% d'homologie de séquence en acides aminés des six segments transmembranaires (Köhler *et al.*, 1996). L'affinité de ces canaux pour l'apamine, peptide de dix-huit acides aminés issue du venin de l'abeille, est liée à deux acides aminés, un acide aspartique et une asparagine, présents au niveau du pore du canal (Ishii, Maylie, & Adelman, 1997). Le nombre d'acides aminés composant les sous-unités α varie en fonction des SKCa notamment au niveau de la partie N-terminale. Les isoformes des SKCa sont constituées respectivement de 543, 579 et 736 acides aminés pour SK1, SK2 et SK3. La partie C-terminale fixe la CaM, conférant au canal SKCa sa sensibilité pour le Ca^{2+} intracellulaire (Bond, Maylie, & Adelman, 1999).

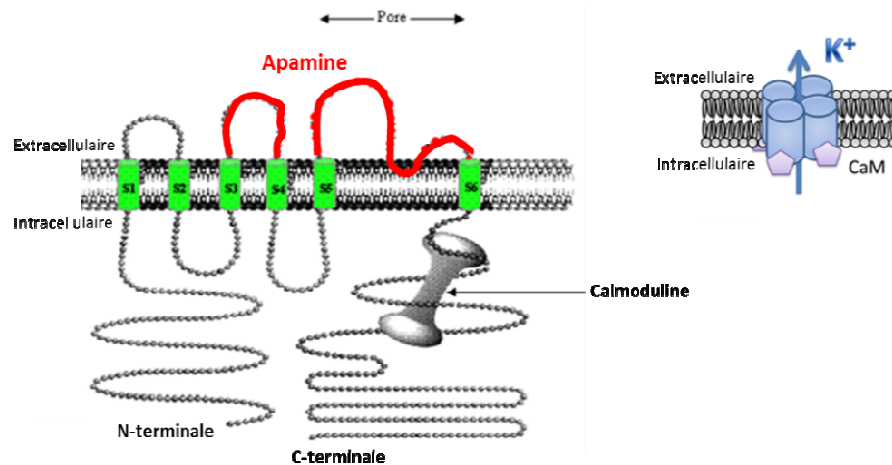


Figure 14: **Structure d'un canal SKCa.**

À gauche, la structure d'une sous-unité α composant un canal SKCa. Chaque sous-unité α est constituée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) et de deux extrémités N et C-terminales intracellulaires. La boucle extracellulaire située entre les segments S5 et S6, constitue le pore du canal, une fois les 4 sous-unités α assemblées. La toxine apamine se fixe sur les boucles entre les segments S3-S4 et S5-S6 de la sous-unité α . La calmoduline (CaM) confère la sensibilité du canal au Ca^{2+} intracellulaire (modifié d'après (Bond *et al.*, 1999)). À droite, schéma représentant quatre sous-unités α s'associant en homo ou hétérotétramères pour former un canal fonctionnel.

Des hétérotétramères composés de différentes protéines SK1, 2, 3 ont été retrouvés. En effet, des canaux constitués de sous-unités α de SK1, SK2 et SK3 ont été décrits dans des myocytes cardiaques de souris (Tuteja *et al.*, 2010). Par ailleurs, une co-expression entre les isoformes humaines SK1 et SK3 provoque la séquestration, causée par SK1, de ces canaux dans le RE (Monaghan *et al.*, 2004). Ces hétérotétramères se forment au niveau des domaines dits «coiled-coil» situés aux extrémités C-terminales. Ces domaines de type en doigt de zinc ont été cristallisés en 2008 (Kim *et al.*, 2007). Les canaux SKCa n'ont pas encore à ce jour été

cristallisés mais une étude préalable qui s'est intéressée à la structure du canal K^+ KcsA, exprimé par une bactérie procaryote *Streptomyces lividans*, a permis de modéliser la structure de ces canaux SKCa (Lamy *et al.*, 2010 ; Dilly *et al.*, 2012) (Figure 15). Prochainement, il est probable qu'il n'y ne soit plus nécessaire de cristalliser le canal pour avoir la structure. En effet, une étude récente montre qu'il est possible d'étudier la structure de canaux par cryo-microscopie électronique comme ce qui a été fait avec l'étude du transport des ions Cl^- par ce canal KB (Park, Campbell, & Mackinnon, 2017).

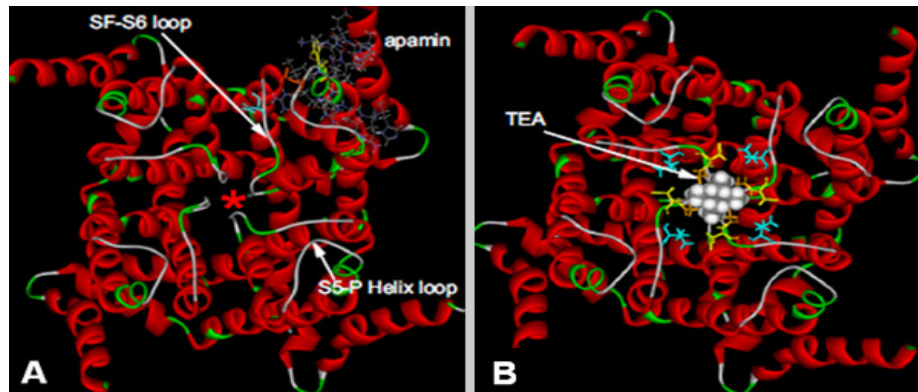


Figure 15: Schémas représentant la modélisation vue de l'extérieur d'une partie d'un canal SKCa.

Le pore du canal est marqué d'un astérisque rouge et les positionnements probables des bloqueurs apamine (A) et Tétrahéthylammonium (TEA) sont indiqués (B) (d'après Lamy and Goodchild *et al.*, 2010).

Les canaux SKCa sont physiquement liés à la CaM via des domaines de liaison spécifiques (CaMBD : CaM Binding Domain) du domaine C-terminale et cette association est à l'origine de la sensibilité pour le Ca^{2+} que présentent ces canaux (Xia *et al.*, 1998). La liaison Ca^{2+} / CaM conduit au changement de conformation du canal provoquant ainsi son ouverture. Le domaine CaMBD est localisé à proximité du pore du canal et l'ouverture de celui-ci est permise grâce à quatre sites de fixation du Ca^{2+} appelés sites « EF-hands » présents sur la CaM, qui forment un motif protéique structural de type hélice-boucle-hélice. Pour qu'il y est assemblage des 4 sous-unités α , il est impératif que chacune soit liée à la CaM, ce qui conduira à l'adressage du canal SKCa à la membrane plasmique (Lee *et al.*, 2003).

4.1.4 Propriétés électrophysiologiques

Les canaux SKCa possèdent une conductance comprise entre 4 et 14 pS (Köhler *et al.*, 1996) (Hirschberg *et al.*, 1998) et leur activation ne dépend pas du potentiel de membrane contrairement aux canaux Kv. Les canaux SKCa n'ont besoin ni d'ATP ni de nucléotides (Xia *et al.*, 1998) mais d'une concentration suffisante de Ca^{2+} cytosolique pour s'activer. Les

canaux SKCa se distinguent des canaux Kv, en ne comportant que deux des sept acides aminés positivement chargés et retrouvés dans le segment S4 avec un des quatre résidus arginine (Köhler *et al.*, 1996 ; Stocker, 2004). Certains de ces acides aminés peuvent interférer avec le fonctionnement, la synthèse et l'adressage de canaux à la membrane plasmique (Gao *et al.*, 2008). Les courants SKCa possèdent une rectification dans le sens entrant pour des potentiels de membrane positifs à partir de +20 mV (Figure 16) (Köhler *et al.*, 1996 ; Hirschberg *et al.*, 1998 ; Xia *et al.*, 1998). Pour les potentiels les plus positifs, l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions Mg^{2+} diminue l'amplitude du courant mesuré. En effet, le Mg^{2+} induit une inhibition du courant qui est dépendante du potentiel de membrane. D'autre part, l'augmentation du K^+ extracellulaire diminue l'effet inhibiteur du Mg^{2+} (Soh & Park, 2001). Une première étude avait montré que cette rectification était liée au blocage du pore des canaux par des cations divalents, de la même manière que pour les canaux Kir (Lu & Mackinnon, 1994). Une seconde étude a, quant à elle, montré que certains acides aminés chargés positivement et situés à proximité du pore du canal, au niveau intracellulaire, pouvaient altérer la conductance du K^+ . Ainsi, la rectification existante pour ces canaux serait une propriété intrinsèque et la conséquence d'interférences électrostatiques au niveau de l'entrée du pore qui modifierait tant la disponibilité du K^+ que celle des ions divalents (Li & Aldrich, 2011).

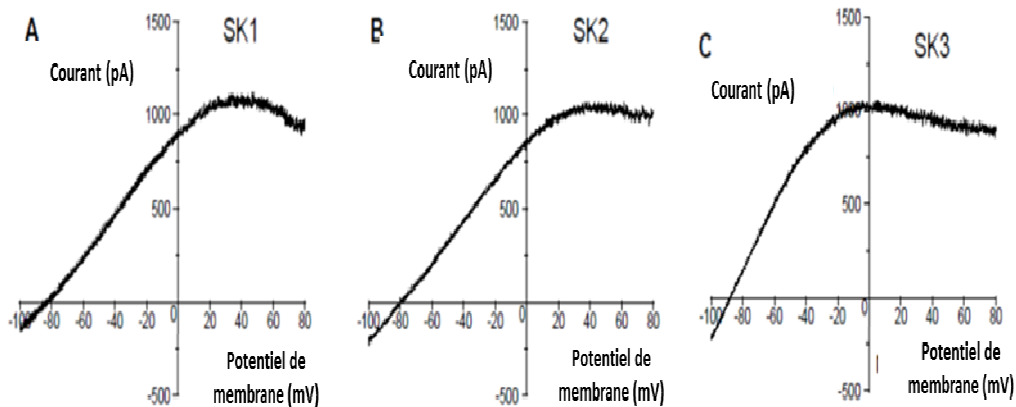


Figure 16: Exemple de courants SKCa rectifiants dans le sens entrant.

Chaque trace représente un courant type SKCa. A. SK1, B. SK2, C. SK3. Ces courants ont été obtenus en patch-clamp en configuration cellule entière, à partir de lignées HEK transfectées pour qu'elles surexpriment les canaux SK1, SK2 et SK3. Le protocole utilisé a été celui de rampe consistant à imposer successivement des voltages de -100 à +80 mV sur une durée de 500 ms. Les enregistrements ont été effectués en présence de $1\mu M$ de Ca^{2+} libre, permettant d'activer les canaux SKCa. Une rectification entrante est perceptible à partir de potentiels plus positifs que 20 mV (d'après Girault *et al.*, 2012).

La concentration de Ca^{2+} nécessaire à la demi-activation des SKCa est de l'ordre de 300-70nM (Stocker, 2004) et il est observé un phénomène de saturation pour des

concentrations supérieures à 10 μM (Xia *et al.*, 1998). La probabilité d'ouverture de ces canaux SKCa dépend de la concentration cytosolique de Ca^{2+} qui leur permet de s'activer lorsqu'elle augmente. Ce mécanisme leur permet de réguler la fréquence des PA selon la concentration cytosolique de Ca^{2+} dans les cellules. Leur activation se fait au travers d'une modification de conformation de la CaM après fixation du Ca^{2+} qui se transmet au segment S6 de la sous-unité α . A l'opposé, la désactivation correspond au décrochage du Ca^{2+} de la CaM (Xia *et al.*, 1998) (Maylie *et al.*, 2003). La sensibilité du canal pour le Ca^{2+} est dépendante d'un complexe multiprotéique constitué de la kinase caséine 2 (CK2), la protéine phosphatase 2A (PP2A) et des sous-unités α des canaux SKCa. En effet, la CaM peut être modulée par la CK2 (phosphoryle la CaM et diminue sa sensibilité au Ca^{2+}) et par la PP2A (augmente la sensibilité de la CaM au Ca^{2+}) qui peuvent réguler son état de phosphorylation et ainsi modifier la sensibilité du canal à la concentration de Ca^{2+} cytosolique (Allen *et al.*, 2007). Il a été montré que la CaM et son domaine de fixation à la sous-unité α régulaient l'adressage à la membrane des canaux IKCa (Joiner *et al.*, 2001). La fixation constitutive de la CaM à la sous-unité α des canaux SKCa est très importante pour l'adressage de ces canaux à la membrane plasmique, notamment pour SK2 (Lee *et al.*, 2003).

4.1.5 Propriétés pharmacologiques

La modulation de canaux SKCa par des produits chimiques se produit principalement via trois mécanismes : par action directe avec le pore des canaux (tels que l'apamine), par modification de la sensibilité du canal à la concentration du Ca^{2+} cytosolique (tant inhibiteurs qu'activateurs) et suite à l'intégration dans les membranes plasmiques modifiant les propriétés biophysiques des membranes (telles que l'Ohmline présentée après). Quelques exemples de modulateurs des canaux SKCa sont présentés avec leurs IC_{50} ou EC_{50} dans le tableau 9.

Tableau 9 : **Modulateurs de l'activité des canaux SKCa.**
(d'après (Wulff & Köhler, 2013) et (Honrath *et al.*, 2017).

		SKCa		
		KCa2.1 (SK1)	KCa2.2 (SK2)	KCa2.3 (SK3)
Inhibiteurs (IC₅₀)	Apamine	1-12 nM	60-400 pM	1-13 nM
	<i>Toxines</i> Leurotoxine I	325 nM	200 pM	1 nM
	Tamapine	42 nM	24 pM	1.7 nM
	B-TMPF	31 nM	1.0 µM	1.3 µM
	NS8593	420 nM	600 nM	730 nM
	UCL 1684	800 pM	280-360 pM	6-10 nM
	Lei-Dab ⁷	6 µM	5 nM	2.5 µM
Activateurs (EC₅₀)	CyPPA	> 100 µM	14 µM	6 µM
	CM-TPMF	24 nM	290 nM	250 nM
	1-EBIO	650 µM	450-650 µM	87-600 µM
	NS13001	> 10 µM	2 µM	140 nM
	NS309	600 nM	620 nM	120-900 nM

Ces modulateurs sont plus ou moins sélectifs des trois isoformes. Par exemple, le CyPPA a une affinité plus importante pour SK3 puis SK2 puis SK1. L'inhibiteur UCL1684 est plus sélectif vis-à-vis de SK1 et SK2 et l'apamine est plus sélective de l'isoforme SK2. Le canal SK2 comporte deux acides aminés, un acide aspartique et une asparagine, alors que le canal SK3 ne possède que l'acide aspartique et aucun pour le canal SK1. L'interaction de ce peptide avec le canal est fait entre une arginine de l'apamine et l'acide aspartique du canal SK3 au niveau de la boucle entre les segments S5 et S6 et entre une glutamine de l'apamine et une asparagine pour le canal SK2 au niveau de la boucle entre les segments S3 et S4 (Ishii, Maylie, & Adelman, 1997).

Certains modulateurs peuvent également agir sur le canal IKCa/SK4, comme le 1-EBIO qui active tous les SKCa et IKCa. Certains modulateurs des canaux SK3 agissent aussi sur un autre canal, le canal Ca²⁺ TRPM7. Ce canal, de la famille des canaux TRPM (Mélastatine), favorise la migration cellulaire en régulant la contractilité et l'adhérence cellulaire (Middelbeek *et al.*, 2012). Le canal TRPM7 peut être activé par des agonistes activant la PLC (Wei *et al.*, 2009 ; Clark *et al.*, 2006) et bloqué par les composés inhibiteurs ou activateurs des SKCa comme l'UCL1684, le CyPPA et le NS8593 (Chubanov *et al.*, 2012). Ce dernier inhibe l'activité du canal TRPM7 avec une IC₅₀ de 1,6 µM ce qui est 2 fois plus que ce qui a été mesuré pour SK3, avec une IC₅₀ de 730 nM (NS8593) (Chubanov *et al.*,

2012 ; Wulff & Köhler, 2014). La plupart de ces modulateurs pharmacologiques des SKCa agissent sur les trois isoformes avec des effets variables et des mécanismes d'action différents. Des activateurs tels que le CyPPA et l'1-EBIO modulent ces canaux en agissant sur le site de la CaM. D'autres agents pharmacologiques comme le NS8593 ont pour site d'action le domaine pore du canal (Figure 17).

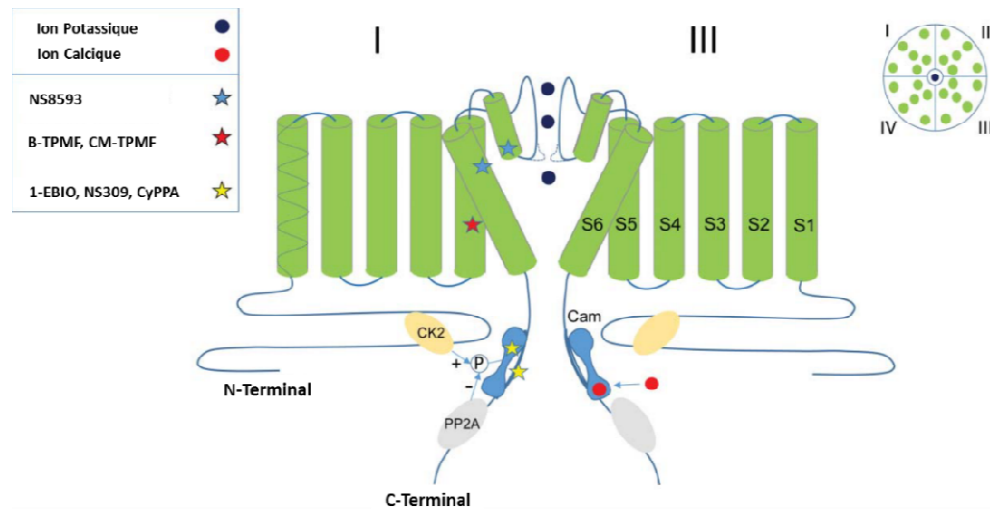


Figure 17 : **Schéma représentant les sites d'actions connus pour quelques modulateurs des canaux SKCa.**

(Cam : Calmoduline ; CK2 : kinase Caséine 2 ; PP2A : protéine phosphatase 2A) (d'après Christophersen & Wulff, 2015).

Au cours de cette thèse, j'ai utilisé principalement l'apamine qui est un peptide issu du venin de l'abeille (*Apis mellifera*). L'apamine bloque tous les SKCa mais pas le BKCa ni l'IKCa. Ce peptide présente cependant une affinité différente selon les trois isoformes (Lamy *et al.*, 2010). L' IC_{50} de l'apamine est plus faible pour le canal SK2 (60-400 pM) que pour SK1 et SK3 (1-12 nM et 1-13 nM respectivement) (Tableau 9). Une autre classe d'inhibiteurs des canaux SKCa, faisant partie de la famille des alkyl-éther-phospholipides, ont été découverts (revue Jaffrès *et al.*, 2016). L'Ohmlin (1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-*sn*-glycéro-Lactose) a été développé au laboratoire en collaboration avec l'équipe de Paul-Alain Jaffrès (Université de Brest, CNRS 6521). Ce composé, contrairement à l'édelfosine, ne présente aucune toxicité tout en conservant la même activité inhibitrice du canal SK3. Contrairement à l'apamine et aux autres molécules connues pour inhiber le canal SK3, l'Ohmlin a l'avantage de ne pas inhiber SK2 et son affinité pour inhiber SK1 reste faible (Girault *et al.*, 2012). Ce composé semble très prometteur puisqu'il est capable de prévenir la formation de métastases osseuses en inhibant l'activité du canal SK3 (Chantôme *et al.*, 2013). À l'aide de tests de compétition avec de l'apamine marquée (test de binding), il a été montré que l'Ohmlin ne déplaçait pas l'apamine de son site de fixation (Girault *et al.*, 2012). Il n'inhiberait pas

l'activité de SK3 en bloquant le pore du canal mais en délocalisant le canal SK3 hors des nanodomains riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques, en s'intégrant dans la membrane plasmique. D'autres molécules analogues à l'Ohmlin sont développées actuellement pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'Ohmlin sur le canal SK3. Il a été constaté que l'introduction d'un groupement phosphate entre le disaccharide et le glycéro-éther produit également des composés qui inhibent le canal SK3. D'autres analogues synthétisés ont conduit à moduler de façon très prometteuse l'activité du canal SK3 (revue Jaffrès *et al.*, 2016).

4.2) Rôles physiologiques des SKCa

Les canaux SKCa ont été décrits dans le système nerveux central et périphérique, les cellules de muscle squelettique, dans les cellules glandulaires et le muscle lisse (Stocker & Pedarzani, 2000 ; Pribnow *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2004). Ces canaux SKCa jouent des rôles importants dans le système nerveux central, régulant l'excitabilité neuronale, de même que la transmission et la plasticité synaptique (Adelman, Maylie, & Sah, 2012 ; Bond *et al.*, 1999; Faber *et al.*, 2008). Les trois sous-familles des canaux SKCa ont des répartitions tissulaires variables. Le canal SK1 est quasi-exclusivement exprimé dans le tissu neuronal (cortex et hippocampe) et a également été détecté dans le pancréas et dans le cœur (Andres *et al.*, 2009; Tuteja *et al.*, 2010). Les canaux SK2 et SK3 sont fortement exprimés dans le système nerveux central (cortex et hippocampe pour SK2 et noyaux monoaminergiques du tronc cérébral pour SK3) et sont aussi présents dans les tissus périphériques (Stocker & Pedarzani, 2000). La protéine SK3 présente les répartitions les plus diverses parmi les canaux SKCa et son ARNm est retrouvé dans de nombreux tissus incluant le tissu musculaire lisse et les endothéliums (Chen *et al.*, 2004). Les trois isoformes sont aussi exprimés de façon fonctionnelle dans les myocytes cardiaques humain et de souris, en particulier dans les myocytes ventriculaires (Diness *et al.*, 2015). Les canaux SK2 et SK3, largement distribués dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, contribuent à la repolarisation auriculaire (Skibsbye *et al.*, 2014). Des études sur des modèles de défaillance cardiaque ont montré que l'expression de ces canaux SKCa était modifiée. En effet, l'expression des canaux SKCa est augmentée dans des cas d'insuffisance cardiaque et l'activation des canaux SKCa peut diminuer la durée des PA pendant les épisodes de fibrillation / défibrillation, ce qui contribue à l'établissement des tachyarythmies ventriculaires (Zhang, Lieu, & Chiamvimonvat, 2016 ; Chiamvimonvat *et al.*, 2017). Il a aussi été montré que les canaux SK3 étaient impliqués dans la différenciation des cellules excitables du cœur. Dans cette étude leur activation entraînait un remodelage du

cytosquelette d'actine, accompagné d'une inhibition de la prolifération cellulaire permettant la différenciation de cellules pluripotentes en cellules cardiaques (Kleger *et al.*, 2010).

Les canaux SKCa régulent la physiologie d'autres types cellulaires. Ainsi le canal SK3 est exprimé dans les muscles lisses des parois utérines et de la vessie, dont les contractions phasiques sont diminuées par le canal SK3 qui induit une hyperpolarisation et une diminution des entrées de Ca^{2+} (Herrera *et al.*, 2003 ; Pierce & England, 2010). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de l'activité de SK3 rétablissait le rythme des contractions utérines phasiques favorables à l'accouchement (Brown *et al.*, 2007). Ce canal SK3 est également connu pour être impliqué dans la régulation de la respiration. L'expression fonctionnelle des canaux SKCa dans les mitochondries a été observée dans les cellules cardiaques du cobaye (Stowe *et al.*, 2013). L'activation du canal SK3 par le 1-EBIO conduit à une formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) tels que des radicaux libres ou des ions oxygénés et des peroxydes (Douda *et al.*, 2015). L'extinction de l'expression du canal SK3, avec des ARN interférents, montrent que le canal SK3 sert de médiateur aux NETs mais indépendamment de la NADPH oxydase (NOX) (Douda *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que le processus de NETose implique le canal SK3 (Douda *et al.*, 2015). Bien que ces canaux K^+ mitochondriaux n'aient pas été identifiés dans les neutrophiles, des données montrent que l'activation du canal SK3 conduit à la production de DRO mitochondrial dans les neutrophiles ; cependant ces données ne permettent pas de dire précisément s'il s'agit du canal SK3 mitochondrial. L'apamine ne passe pas la membrane plasmique et exerce un effet inhibiteur sur la NETose, suggérant par conséquent qu'il s'agisse en fait du canal SK3 de la membrane plasmique (Douda *et al.*, 2015). Récemment, des études montrent la présence du canal SK2 dans les mitochondries des cellules neuronales et montrent aussi que l'influx de K^+ dans les mitochondries modifie le potentiel de membrane mitochondrial (Dolga *et al.*, 2013).

4.3) Les canaux et récepteurs partenaires des SKCa

4.3.1 SKCa et NMDA

Dans les neurones pyramidaux de l'amygdale et de l'hippocampe, les canaux SKCa sont situés au niveau des épines dendritiques, où ils sont activés par l'influx de Ca^{2+} à travers les récepteurs au NMDA (récepteurs activés par l'agoniste N-méthyl-D-aspartate). Ces canaux SKCa ont pour rôle d'atténuer la transmission synaptique excitatrice en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les potentiels post-synaptiques excitateurs (Ngo-anh *et al.*, 2005). Il a également été observé que lors de la transmission synaptique basale, le flux de Ca^{2+} généré par les récepteurs NMDA et par les canaux Ca^{2+} de type L activait les canaux SKCa

postsynaptiques (Faber *et al.*, 2010). Ces canaux une fois activés, atténuent les réponses synaptiques. A l'inverse, le blocage des canaux SKCa révèle une activation plus importante des récepteurs NMDA présents sur les neurones pyramidaux (Faber *et al.*, 2010). Dans les neurones dopaminergiques, l'activation des récepteurs canaux NMDA permet d'augmenter l'amplitude des courants SKCa grâce à l'influx Ca^{2+} généré par les NMDA (Paul, Keith, & Johnson, 2003). Les canaux SK2, dans les dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe, sont localisés à proximité des récepteurs NMDA. L'ouverture des canaux SK2 diminue l'ouverture des canaux NMDA, causée par l'hyperpolarisation de la membrane en potentialisant leur blocage par le Mg^{2+} . Dans les neurones de l'hippocampe en culture, il a été observé que l'application de NMDA permettait d'activer les canaux SKCa et non les BKCa (Shah & Haylett, 2002). En effet, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} médié par les récepteurs NMDA active des courants K^+ sensibles à l'apamine (Shah & Haylett, 2002 ; Ngo-anh *et al.*, 2005).

4.3.2 Couplage CaVs et SKCa

La mise en évidence d'un couplage fonctionnel entre les canaux CaVs et les canaux SK2 a été réalisé sur des myocytes auriculaires. En effet, un couplage entre les CaV1.2 et CaV1.3 et le canal K^+ SK2 a été montré (Lu *et al.*, 2007). Il a également été observé qu'il existait des colocalisations entre canaux SKCa et CaV1.X dans les neurones de l'hippocampe et de même qu'entre les canaux SKCa et CaV3.X dans les neurones dopaminergiques. Ces canaux Ca^{2+} et K^+ colocalisés pourraient former un complexe de signalisation Ca^{2+} (Marrion & Tavalin, 1998; Wolfart & Roeper, 2002 ; Guéguinou *et al.*, 2015). Ce canal limiterait l'influx de Ca^{2+} initiés par les canaux CaV1.X, de façon à réguler le rythme des contractions utérines phasiques propices à l'accouchement. Le canal SK3 régulerait donc le couplage excitation-contraction des fibres musculaires utérines en modulant l'activité des CaVs (Brown *et al.*, 2007).

4.3.3 Couplage SKCa et Orai1

Dans les cellules cancéreuses du sein, MDA-MB-435s, la protéine SK3 est associée avec un canal Ca^{2+} non dépendant du potentiel, Orai1. Ces deux protéines vont former un complexe canalaire SK3-Orai1 permettant une entrée constitutive de Ca^{2+} dans les cellules favorisant la migration des cellules cancéreuses (Chantôme *et al.*, 2013). Ce complexe SK3-Orai1 est localisé dans des nanodomains riches en lipides et sphingolipides (les radeaux lipidiques) et favorise la migration des cellules cancéreuses du sein. Des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET suggèrent que le canal Orai1 serait associé physiquement au

canal SK3 (Gueguinou *et al.*, 2017). L'application d'Ohmlin entraîne une délocalisation du complexe canalaire SK3-Orai1 en dehors des radeaux lipidiques, ce qui avait pour conséquence de diminuer l'entrée constitutive de Ca^{2+} , la migration cellulaire et le développement de métastases osseuses (Chantôme *et al.*, 2013). Le canal SK3 est également exprimé dans les cellules épithéliales cancéreuses de la prostate (résultats du laboratoire non publiés). Le canal SK3 n'a pas été observé dans les cellules épithéliales normales de la prostate, contrairement au canal Orai1 (Chantôme *et al.*, 2013). Un complexe SK3-Orai1 a également été retrouvé dans les cellules musculaires lisses où il hyperpolarise la membrane plasmique et contrôle ainsi les contractions excessives en réponse à des agonistes (Song *et al.*, 2015).

4.3.4 Interactions entre SK3 avec TRPC1, Orai1 et STIM1

Dans les cellules cancéreuses coliques HCT-116, les canaux Orai1 et TRPC1 sont associés au canal SK3 au sein des radeaux lipidiques. Ces canaux SK3/Orai1/TRPC1 localisés dans des nanodomains membranaires participent à la régulation de l'entrée de Ca^{2+} SOCE (Store Operated Ca^{2+} Entry) activée par STIM1 et favorisée par la déplétion en Ca^{2+} du RE. Cette entrée SOCE favorise ensuite la migration des cellules cancéreuses HCT-116. La formation de ce complexe est liée à la phosphorylation de la protéine réticulaire STIM1 par AKT. L'influx SOCE active AKT et le canal SK3 induit une amplification de cet influx SOCE en favorisant la force électromotrice pour le Ca^{2+} grâce à l'hyperpolarisation de la membrane. Cette boucle de rétroaction positive conduit également à favoriser la migration des cellules cancéreuses (Gueguinou *et al.*, 2017).

4.4) Expression et fonctions dans les cellules cancéreuses

De nombreuses études ont reporté une modification de l'expression des canaux K^+ dans le cancer dont SK3. Ainsi, le canal SK3 est exprimé dans les cancers du sein, de la prostate, dans des cellules urothéliales, du tractus gastrique ainsi que dans le mélanome (Huang & Jan, 2014 ; Steinestel *et al.*, 2016 ; Girault *et al.*, 2012). Dans un contexte physiologique, les canaux SKCa régulent l'excitabilité neuronale et musculaire, tandis que dans un contexte tumoral, la fonction physiologique des canaux SKCa est détournée dans la cellule cancéreuse pour conduire à des fonctions biologiques essentielles pour le développement de la tumeur (Girault *et al.*, 2012). Il a été démontré que le canal SK2 pouvait favoriser la prolifération cellulaire. En condition d'hypoxie ou en présence de composés mimant cette condition, les cellules de mélanome IGR-1 surexpriment le canal SK2 qui va ensuite favoriser leur prolifération (Tajima *et al.*, 2006). Concernant le canal SK3, des études

menées au laboratoire ont montré qu'il était impliqué dans la migration des cellules cancéreuses du sein, de mélanome et du côlon (Potier *et al.*, 2006 ; Chantôme *et al.*, 2009 ; Potier *et al.*, 2010 ; Gueguinou *et al.*, 2017) et l'équipe de Steinestel a montré son rôle dans les cellules urothéliales (Steinestel *et al.*, 2016) (Figure 18).

Le canal SK3 régule également la migration des HCT-116 (Guéguinou *et al.*, 2016). En effet, dans ces cellules, le complexe Orai1/TRPC1/SK3 dans les nanodomains riches en cholestérol favorise l'influx SOCE. La P-Akt phosphoryle STIM1 qui va favoriser l'influx SOCE et activer Rac1, amplifiant l'influx SOCE et augmentant la migration. Par ailleurs, le canal SK3 ne régule pas la prolifération des cellules cancéreuses (Chantôme *et al.*, 2013). Pour le moment, il n'est pas encore établi que le canal SK3 soit exprimé de façon homogène sur la membrane plasmique des cellules ou bien qu'il soit exprimé à des régions spécifiques situées à l'avant ou à l'arrière des cellules. Néanmoins, quelle que soit l'expression de ce canal SK3, il est probable que son activation soit plus importante à l'arrière de la cellule où la concentration cytosolique en Ca^{2+} est la plus élevée pendant la migration cellulaire (Wei *et al.*, 2009). Par ailleurs, c'est dans le front de migration des cellules que l'activité de la PKA semble la plus élevée (Howe *et al.*, 2005) et cette dernière réduit l'activité du canal SK3 (Clarysse *et al.*, 2013). Ainsi, l'activation du canal SK3 à l'arrière des cellules entrainerait l'hyperpolarisation de la membrane plasmique induisant l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} liée à l'augmentation de la force électromotrice (Potier *et al.*, 2006). Cette entrée de Ca^{2+} activerait par la suite les calpaïnes (Chantôme *et al.*, 2013) qui vont contribuer à de nombreux aspects de la migration cellulaire, tels que l'étalement des cellules, la protrusion de la membrane, la chimiotaxie et la formation du complexe d'adhérence (Franco & Huttenlocher, 2005).

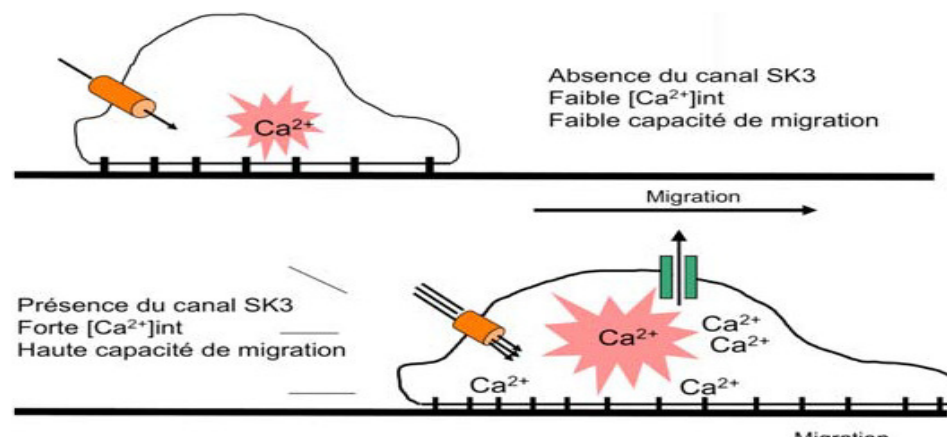


Figure 18 : Rôle du canal SK3 dans la migration des cellules cancéreuses du sein et de mélanomes (d'après Potier *et al.*, 2006).

V). Régulation des canaux CaV1.X et SKCa par l'AMPc :

Implication dans la migration cellulaire

5.1) Homéostasie de L'AMPc

5.1.1 L'adénylate cyclase (AC)

Le maintien d'une concentration d'AMPc basse dans la cellule suite à la synthèse de l'AMPc par l'adénylate cyclase (AC) est lié à l'activité des phosphodiésterases (PDEs). Ces enzymes permettent l'hydrolyse de l'AMPc en 5'AMP. Cette dégradation de l'AMPc est très rapide, c'est-à-dire même plus rapide que la synthèse d'AMPc par les ACs ; l'équilibre est en faveur des PDEs qui permettent de maintenir une faible concentration d'AMPc intracellulaire.

L'AC catalyse la synthèse de l'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc se lie à la sous-unité régulatrice de la kinase dépendante de l'AMPc (la PKA) et active cette kinase qui va alors phosphoryler des résidus spécifiques thréonine ou sérine composant les protéines cibles au niveau du cytosol et du noyau. Les ACs sont au nombre de dix isoformes, dont neuf isoformes transmembranaires (notées TMAC1 à TMAC9) et une soluble (appelée sAC). Les activités des AC de type 1, 3 et 8 peuvent être régulées par le complexe Ca^{2+} / CaM. Par conséquent, des changements dans la concentration cytosolique du Ca^{2+} influencent également la concentration intracellulaire de l'AMPc. L'AC est une large protéine transmembranaire qui est composée de deux domaines hydrophobes comprenant chacun six hélices transmembranaires (notées TM1 et TM2) (Figure 19). Les deux domaines hydrophobes sont reliés entre eux par deux boucles hydrophiles intracellulaires (C1a et C1b). L'interaction entre les boucles hydrophiles C1 et C2 est essentielle pour la catalyse de l'enzyme. Il a été identifié que les domaines C1a et C2a s'associent pour former le noyau catalytique, tandis que les domaines C1b, C1a et C2a se lient aux molécules régulatrices (Figure 19). La sous-unité α de la protéine Gas (activatrice de l'AC) et la forskoline (FSK) (diterpène isolée des racines de *Coleus forskohlii*, activateur de l'AC) s'associent principalement à la boucle C2 ; alors que la sous-unité α de la protéine Gai s'attache à la boucle C1 et réduit la production de l'AMPc par inhibition de l'AC (revue Sunahara & Taussig, 2002).

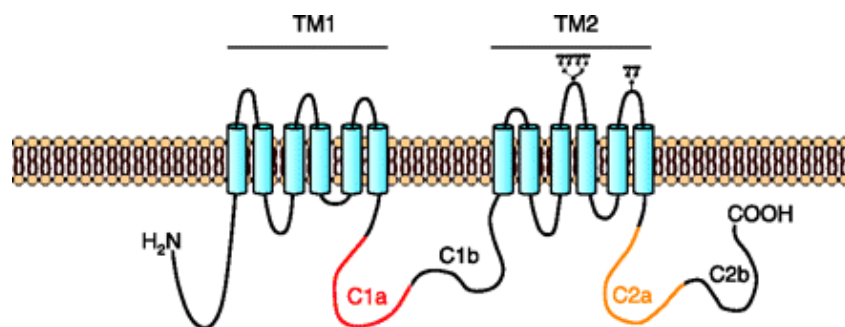


Figure 19 : **Topologie générale de l'Adénylate cyclase.**

Abréviations : NH₂, extrémité N-terminale, TM1-TM2, les domaines transmembranaires, C1a-C1b-C2a-C2b, les fragments cytoplasmiques catalytiques, COOH, extrémité C-terminale (d'après Willoughby & Cooper, 2007).

5.1.2 Les phosphodiésterases (PDEs)

Il existe de nombreuses isoformes de ces PDEs avec 21 gènes identifiés dans le génome humain (revue Conti & Beavo, 2007). Parmi les familles de PDEs, les PDEs 4, 7 et 8 sont spécifiques de l'AMPc ; les autres sont soit spécifiques du GMPc (Guanine Mono Phosphate cyclique) (PDE 5 ; 6 et 9) soit hydrolysent à la fois l'AMPc et le GMPc (PDE 1 ; 2 ; 3 ; 10 et 11). Dans cette étude, la PDE qui a retenu notre attention est la PDE4, qui représente la plus grande famille des PDEs. Il existe quatre gènes codants pour les PDE4, notés A, B, C, D et pouvant générer par épissage alternatif une cinquantaine de sous-types. Les principales différences entre ces variants d'épissage reposent sur la taille de la partie N-terminale. Il existe des isoformes de PDE4 courtes et d'autres longues. Au niveau de la région N-terminale, il a été trouvé deux domaines très conservés : UCR 1 et 2 qui sont des domaines régulateurs contrôlant la conformation du site catalytique. Les formes longues possèdent les deux régions UCR alors que les formes courtes seulement la région UCR 2. La présence de ces domaines intervient directement dans la régulation du site catalytique de ces enzymes et dans leur localisation. La phosphorylation des formes longues des PDE4 par la PKA augmente leur activité. Les PDE4 dégradent spécifiquement l'AMPc et joueraient un rôle fondamental de régulateurs de la concentration intracellulaire d'AMPc (Conti *et al.*, 2003). Chaque type cellulaire possède ses ACs et PDEs comprenant différentes isoformes de ces deux enzymes. Ces multiples combinaisons donnent naissance à diverses variations temporelles et spatiales de concentration d'AMPc.

5.2) La PKA

La PKA est très étudiée du fait de son implication dans de nombreuses voies de signalisation, clés pour la physiologie humaine, telles que les voies responsables du couplage

excitation / contraction cardiaque. Elle représente l'effecteur classique de l'AMPc et on dénombre plus de 150 protéines connues pour être phosphorylées par la PKA. Les cellules de mammifères ont au moins deux types de PKA: la PKA de type I et celle de type II. Toutes deux ont des sous-unités catalytiques (C) identiques (C α , C β ou C γ), mais des sous-unités régulatrices (R) différentes (RI (α ou β) ou RII (α ou β)) (Neary *et al.*, 2004). Ces deux types se distinguent également par leurs localisations subcellulaires. Les PKAs de type I sont principalement localisées dans le cytosol, tandis que celles de type II sont localisées au niveau membranaire (noyau, réticulum, appareil de Golgi, mitochondrie...) où elles sont très souvent associées à leurs protéines cibles dans des complexes de signalisation, grâce aux protéines d'ancrage, AKAP (A-kinase anchoring protein) (Negro *et al.*, 2009). La PKA est constituée d'un tétramère de deux sous-unités C et de deux sous-unités R. Lorsque la concentration en AMPc est faible, l'enzyme est inactive et les sous-unités R et C sont associées. Lors de l'augmentation de la concentration d'AMPc, quatre molécules de ce substrat vont se fixer à raison de deux molécules d'AMPc par sous-unité R. La fixation de l'AMPc entraîne un changement de conformation des sous-unités R, à l'origine de leur dissociation. Les deux sous-unités C vont ensuite fixer l'ATP et devenir actives (Naviglio *et al.*, 2010). Les sous-unités C ainsi libérées peuvent phosphoryler les protéines cibles, en transférant le groupement phosphate de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine. Les sous-unités R restent dans le cytoplasme (Figure 20).

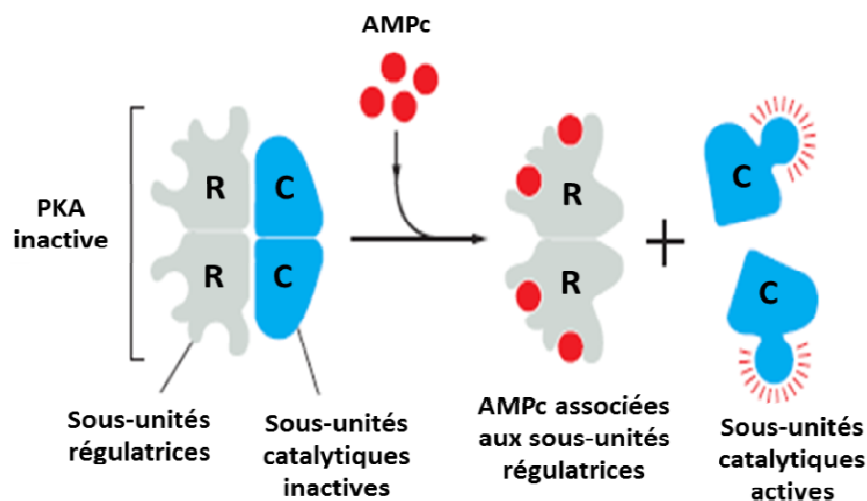


Figure 20: **Représentation schématique de la PKA et de son activation.**

La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices (R) du tétramère PKA induit un changement de conformation, provoquant la dissociation des sous-unités régulatrices des sous-unités catalytiques (C). Cela active ainsi l'activité kinase des sous-unités catalytiques. La libération de ces sous-unités catalytiques nécessite la liaison de plus de deux molécules d'AMPc aux sous-unités régulatrices dans le tétramère (d'après Alberts *et al.*, 2003, « MolecularBiology of the Cell, 4th edition »).

Par ailleurs, la PKA peut phosphoryler les PDEs, les rendant actives et ainsi entrainer un rétrocontrôle négatif permettant d'éteindre le signal d'AMPC intracellulaire (Rochais *et al.*, 2004).

5.3) Migration dépendante de la voie AMPC-PKA

La PKA peut exercer à la fois des effets négatifs et positifs sur la migration cellulaire (Howe *et al.*, 2005). La PKA est un régulateur important de la signalisation cellulaire et de diverses fonctions biologiques. Des études antérieures ont montré que la mobilité cellulaire est finement contrôlée par la synthèse et la répartition spatiale et temporelle de l'AMPC. La PKA régule les événements clés de la signalisation essentiels pour le remodelage du cytosquelette et de la polarisation cellulaire pendant la migration. Elle régule également les activités de RhoA, Rac, cdc42, Pak et c-Abl. Par exemple, il est connu que la PKA inhibe l'activation de RhoA, alors qu'elle est nécessaire pour l'activation de Rac1 ;deux protéines qui sont régulées lors de la migration cellulaire (Paulucci-holthauzen *et al.*, 2009). Le rôle de la PKA dans la migration cellulaire dépend très fortement de sa localisation avec des protéines d'ancrages, les AKAPs. La PKA joue un rôle prépondérant pour l'initiation et le maintien d'une migration cellulaire efficace (Howe *et al.*, 2005 ; Lim *et al.*, 2008 ; Paulucci-holthauzen *et al.*, 2009). De plus, la PKA peut moduler la migration cellulaire, lors du développement vasculaire, en supprimant la polarité cellulaire ainsi que la migration des cellules endothéliales tout en augmentant l'activité de la cadhérine (glycoprotéine exprimée à la membrane plasmique des cellules et assurant l'adhérence cellulaire) permettant ainsi de favoriser l'adhérence des cellules. L'AMPC est également connu comme étant un régulateur négatif important de la migration des cellules vasculaires de muscle lisse (CVML). L'activation des récepteurs β -adrénergiques par l'isoprénaline augmente la concentration d'AMPC intracellulaire comme le fait la FSK en activant les ACs. Ces concentrations intracellulaires élevés d'AMPC induisent l'inhibition de la migration des CVML (Goncharova *et al.*, 2012). De plus, une étude récente a montré que les PDE1C régulent négativement la croissance, la migration et l'hyperplasie des cellules CVML, suggérant que l'AMPC favorise la prolifération et la migration des CVML (Cai *et al.*, 2015). Dans les cellules CVML, une augmentation significative de l'activité de la PKA est observée lors de l'application de AT-RvD1, résolvine D1 (médiateur lipidique anti-inflammatoire), couplée à de l'aspirine. La migration cellulaire était altérée lors de cette application d'AT-RvD1, ce qui semble montrer un lien entre la voie AMPC-PKA et la migration des cellules CVML (Mottola *et al.*, 2017).

Egalement, la FSK entraîne l'inhibition de la migration de plusieurs types de cellules cancéreuses (Burdyga *et al.*, 2013 ; Dong *et al.*, 2015).

5.4) Régulation des CaV1.X par la voie AMPc-PKA

Les canaux CaV1.X sont modulés par les récepteurs couplés aux protéines G (Carabelli *et al.*, 1996 ; Hernandez-Guijo *et al.*, 1999 ; Hernández *et al.*, 2011) ou sont régulés en amont par la voie AMPc-PKA (Mahapatra *et al.*, 2012). Le canal CaV1.2 est sensible à la PKA qui le phosphoryle au niveau de ses sous-unités $\alpha 1$ sur les sérines Ser1700 (dans les cellules cardiaques) et Ser1901 (dans les cellules neuronales) (Fuller *et al.*, 2011). De même, la sous-unité β du CaV1.2 peut être phosphorylée au niveau des Ser478, Ser479 et Ser459 (Gerhardstein *et al.*, 2000). La même chose pourrait se produire avec la sous-unité $\alpha 1D$ du canal CaV1.3 pour laquelle la PKA phosphoryle les sérines Ser1964, Ser1743, Ser1816 et Ser1928 (Ramadan *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 2001).

Les courants Ca^{2+} de type CaV1.X peuvent être régulés positivement par l'AMPc intracellulaire, tout comme le canal CaV1.2, au cours de la régulation sympathique des battements cardiaques (Catterall, 2011). Une étude sur des cellules chromaffines, montre qu'une stimulation de la voie AMPc-PKA par de la FSK augmentait l'amplitude des courants CaV1.X (Vandael *et al.*, 2013). A l'inverse, une application d'inhibiteur spécifique de la PKA, le H89, induisait une forte diminution de l'amplitude des courants CaV1.X (Vandael *et al.*, 2013).

Les canaux CaV1.X sont également régulés négativement par la PKG. Cette PKG peut phosphoryler la sous-unité $\alpha 1$ du CaV1.2 sur la Ser533 (Jiang *et al.*, 2001) et la sous-unité β du CaV1.2 sur la Ser496 (Jiang *et al.*, 2001). Les deux mécanismes, PKA et PKG, agissent donc de manière opposée (Marcantoni *et al.*, 2007) et donnent lieu à des changements opposés d'amplitude de courant Ca^{2+} (Mahapatra *et al.*, 2012) (Figure 21). Cela n'exclut pas la possibilité que des sites sensibles à la phosphorylation par la PKA ou la PKG puissent interférer mutuellement sur l'activité de ces canaux.

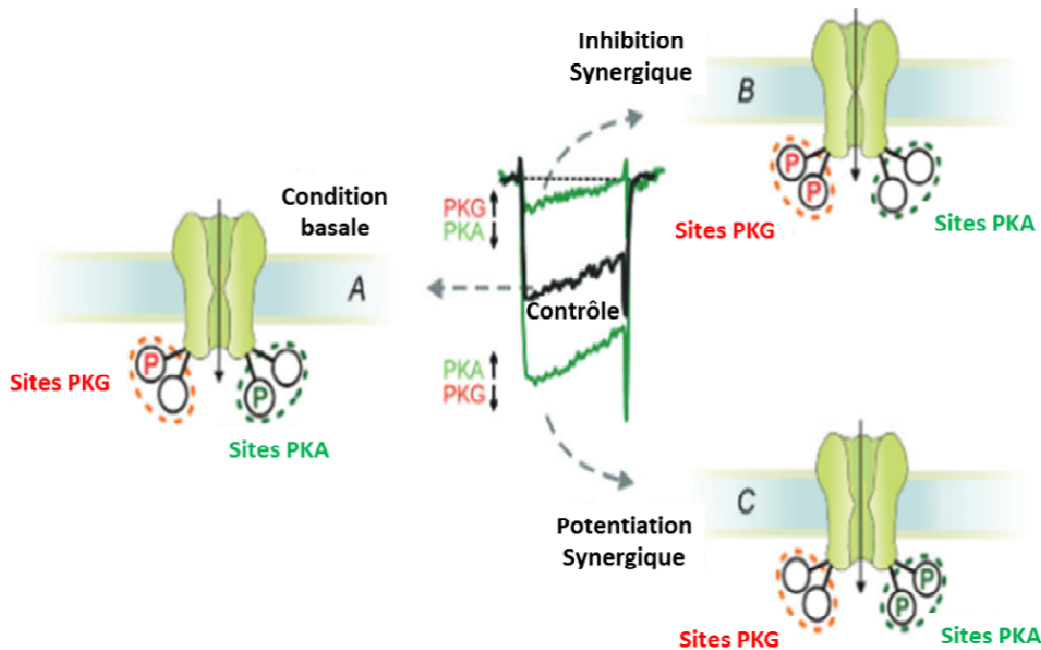


Figure 21: **Représentation schématique de la sous-unité α_1 du canal CaV1 avec deux sites de phosphorylation par la PKA et la PKG.**

Dans les conditions basales, les sites PKA et PKG (P) sont partiellement phosphorylés et non phosphorylés (A). Les états de phosphorylation et de déphosphorylation entraînés par des régulations positives par la PKA et la PKG se déroulent indépendamment l'une de l'autre pour atteindre deux conditions extrêmes : l'inhibition synergique de l'amplitude du courant Ca^{2+} pour laquelle il y a augmentation de l'activité de la PKG et diminution de l'activité PKA conduisant à deux sites PKA déphosphorylés et deux sites PKG phosphorylés (B) (courant CaV1.X minimal) et la potentiation synergique pour laquelle il y a une augmentation de l'activité PKA et une diminution de l'activité PKG avec deux sites PKA phosphorylés et deux sites PKG déphosphorylés (C) (courant maximal CaV1.X). L'emplacement de quatre sites (P) au niveau intracellulaire reste indicatif (d'après Mahapatra *et al.*, 2012).

5.5) Régulation des SKCa par la voie AMPc-PKA

La PKA exerce une régulation négative des canaux SKCa. En effet, la PKA va diminuer l'expression à la membrane des canaux SKCa en augmentant leur internalisation (Abiraman *et al.*, 2016). La stimulation de la voie AMPc-PKA entraîne l'internalisation des canaux SK2 et les maintient confinés au niveau de RE, avec seulement 10% d'expression des canaux SK2 à la membrane plasmique (Abiraman *et al.*, 2016). Dans les cellules de Purkinje, la régulation négative de SK2 serait liée à l'activation des fibres parallèles et à la plasticité de ces cellules qui sont dépendantes de l'activité de la PKA (Belmeguenai *et al.*, 2010 ; Hosity *et al.*, 2011). Aussi, les canaux SK2 sont dans des « clusters » sous contrôle de l'activité de la PKA qui serait dépendante des isoformes de SK2. Les deux isoformes diffèrent par la longueur de leur extrémité N-terminale et la forme longue contient une série de résidus cystéine ainsi que plusieurs sites de phosphorylation pour la PKA (Abiraman *et al.*, 2016).

Contrairement à la forme courte de SK2, les formes longues seraient plus susceptibles d'être régulées négativement dans ces clusters via la PKA (Abiraman *et al.*, 2016). L'adressage membranaire des SKCa est également modulé par la PKA, via l'activation des récepteurs β -adrénergiques dans les neurones pyramidaux de l'amygdale. En effet, la PKA active le recyclage de SK2. Ce phénomène est impliqué dans la plasticité neuronale, en permettant d'accélérer la transmission synaptique de ces neurones spécialisés dans la potentialisation de la mémoire liée aux émotions (Faber *et al.*, 2008). De plus, une autre étude a montré que l'expression du canal SK2, représentant le plus proche parent de SK3, est régulée par la PKA (Ren *et al.*, 2006). Ainsi, une augmentation de la concentration d'AMPC réduit l'activité du canal SK2 et diminue sa localisation à la membrane plasmique par phosphorylation par la PKA de trois résidus sérines : Ser568, Ser569 et Ser570 (Ren *et al.*, 2006). Aucun de ces sites de phosphorylation par la PKA du domaine C-terminale de SK2 (RX1-2 (S / T) X, n'a été retrouvé dans la sous-unité α des canaux SK1 et SK3 (Ren *et al.*, 2006). Une autre étude de l'expression endogène de SK2 dans les neurones CA-1 de l'hippocampe chez la souris, montre que la PKA favorise l'internalisation et le turn-over du canal SK2 à la membrane ; ce qui permet une potentialisation à long terme de ces neurones (ou LTP pour Long Term Potentiation) (Lin *et al.*, 2008).

Au cours de cette thèse, quatre sites potentiels de phosphorylation de la PKA ont été identifiés dans des domaines intracellulaires en N-terminale (les Ser133, Ser172, Ser197 et Ser289) ainsi que trois sites en C-terminale (les Ser627, Ser677 et Ser704) (Figure 22). Une étude du laboratoire a montré une régulation négative de l'activité du canal SK3 par la voie AMPc-PKA dans des cellules HEK293T surexprimant le canal SK3 de rat (Clarysse *et al.*, 2013). De l'isoprénaline (agoniste β 2-adrénergique) avait été appliqué ainsi que la FSK, dans le but d'induire une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire favorisant ainsi la phosphorylation du canal rSK3 par la PKA. Il avait alors été montré que la diminution de l'activité du canal rSK3 était due à la phosphorylation par la PKA de sites sérines présents sur la sous-unité α du canal SK3 et non à une diminution de l'activité des canaux par internalisation (Clarysse *et al.*, 2013).

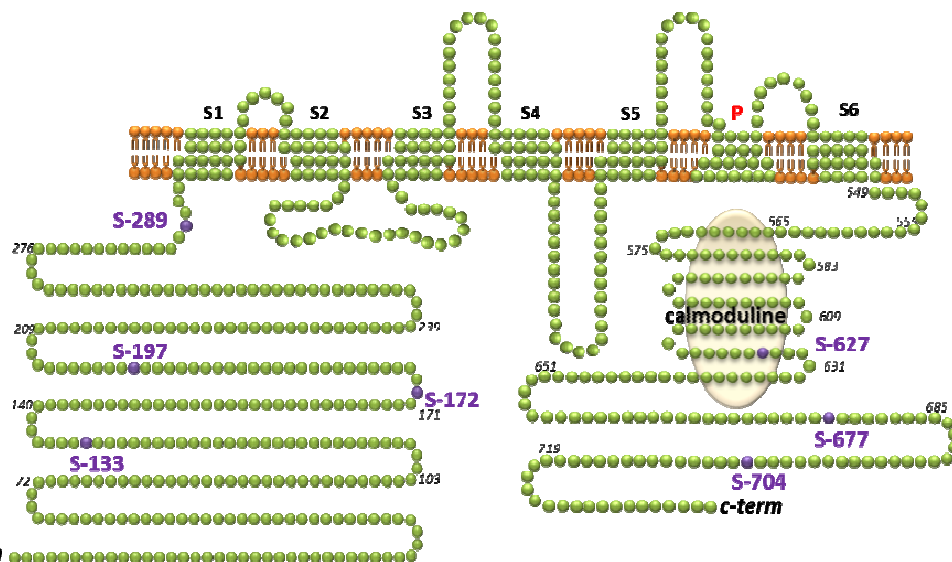


Figure 22: Sites de phosphorylation de la PKA du canal SK3 humain.

Le canal SK3 humain avec les six domaines transmembranaires putatifs et les domaines intracellulaires amino- et carboxy-terminaux (N-term et C-term, respectivement). Quatre sites de phosphorylation de PKA ont été identifiés dans des domaines intracellulaires en N-terminale : Serine (Ser) 133, Ser172, Ser197 et Ser289 ; et trois sites en C-terminale : Ser627, Ser677 et Ser704. Le site Ser289 se trouve dans une région de SK3 qui est à la jonction du premier domaine transmembranaire. Les sites de phosphorylation de PKA sont représentés par des cercles violets et le pore du canal SK3 est représenté par P en rouge entre les segments 5 et 6.

La technique de mutagenèse dirigée, des sites phosphorylables par la PKA, a permis d'identifier parmi les sites possibles ceux qui sont potentiellement impliqués dans l'inhibition de l'activité du canal et de la migration des cellules cancéreuses, suite à l'élévation du niveau d'AMPc intracellulaire (Clarysse *et al.*, 2013). L'un des objectifs de cette thèse était, entre autre, d'identifier les sites de phosphorylation (résidus sérines) de SK3 par la PKA et d'étudier les conséquences de la mutation de ces sites sur la biologie des cellules cancéreuses.

Matériels et méthodes

I). Lignées et culture cellulaire

1.1) Lignée HCT-116

La lignée épithéliale cancéreuse colique HCT-116 (Figure 23) a été obtenue chez le groupe Américain American Type Culture Collection (ATCC). Cette lignée permet d'obtenir un modèle cellulaire de cancer du côlon. Elle est mutée Kras activant une action constitutive des voies PI3K / AKT et RAS / MAPK conduisant à un haut potentiel prolifératif de ces cellules. Ces cellules expriment le canal Ca^{2+} , CaV1.3, le canal K^+ , SK3 et les récepteurs β 2-adrénergiques.

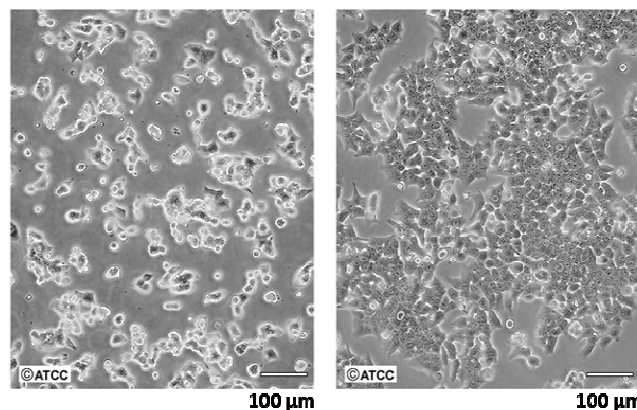


Figure 23: Morphologie des cellules HCT-116 à faible (gauche) et haute densité (droite).

Ces images ont été obtenues sur le site de l'ATCC <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx#characteristics>

1.2) Lignée HEK

Cette lignée rénale embryonnaire (Figure 24) a été immortalisée à l'aide de l'antigène T du virus simien SV40 et elle n'exprime pas le canal SK3 de manière endogène. Au cours de cette thèse, plusieurs lignées de cellules HEK293T ont été utilisées pour les expériences de patch-clamp (Tableau 10):

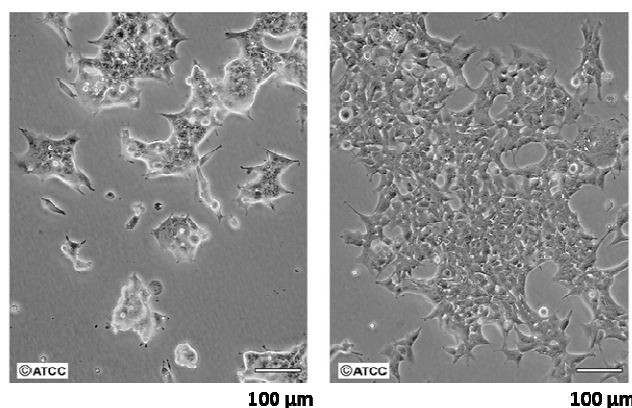


Figure 24: Morphologie des cellules HEK293T à faible (gauche) et à haute densité (droite).

Ces images ont été obtenues sur le site de l'ATCC <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx#characteristics>

Tableau 10: Représentation des différentes lignées cellulaire de HEK293T utilisées.

Lignée cellulaire	Espèce	Transfection	Protéine
HEK293T rSK3	Rat	Stable	SK3
HEK293T rSK3 S285A	Rat	Transitoire	SK3 mutée Sérine 289
HEK293T hSK3	Humaine	Stable	SK3
HEK293T hSK3 HA N-terminale	Humaine	Stable	SK3 avec motif d'hémagglutinine (HA)
HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A	Humaine	Stable	SK3 HA mutée S289A
HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A	Humaine	Stable	SK3 HA mutée S289A-S197A-S172A-S133A

Ces lignées nous ont permis d'étudier facilement les courants portés par ces canaux à l'aide de la technique de patch-clamp et de comparer les effets d'une stimulation de la voie AMPc-PKA sur le canal SK3.

II). Solutions et molécules utilisées

2.1) Solutions et milieux de culture cellulaire

2.1.1 Milieu de culture cellulaire

Les cellules HEK293T ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, BioWhittaker®, Lonza, Belgique) contenant 5% de SVF (Lonza, Belgique). Les cellules HCT-116 ont été cultivées dans de l'Opti-MEM® (I-GlutaMAX™-I ; Gibco, Life Technologies, UK) complété avec 10% de SVF HyClone (Thermo Scientific, USA). Les cellules sont cultivées à 37°C, avec 5% de CO₂ et avec un taux d'humidité constant.

2.1.2 Phosphate Buffered saline Solution (PBS) et Trypsine-EDTA

La solution de D-PBS (Lonza, USA) ne contient ni Ca²⁺ ni Mg²⁺ et permet de « laver » les cellules de leur milieu de culture. La suppression du Ca²⁺ dans l'environnement cellulaire va fragiliser les liaisons des cellules entre elles ainsi qu'au support, ce qui facilitera leur décollement. Le pH de cette solution se situe entre 7,2 et 7,4 et son osmolarité est comprise entre 257 et 302 mOsm/kg. La composition est la suivante (mg/L) : KCl 200, KH₂PO₄ 200, NaCl 8000, Na₂HPO₄ 2160, Glucose 1000, Sodium Pyruvate 36. La solution de Trypsine-EDTA 1:250 (Lonza, USA) permet de mettre en suspension les cellules adhérentes par protéolyse des protéines d'adhésion intercellulaire et d'adhérence au support. Elle ne contient ni Ca²⁺ ni Mg²⁺. La solution contient également un chélateur de Ca²⁺ et de Mg²⁺, l'EDTA, qui permet de fragiliser les liaisons dépendantes du Ca²⁺ entre les cellules ou les liens au support. L'activité de cette enzyme est maximale à 37°C et l'arrêt de la réaction est provoqué par ajout de milieu contenant du SVF qui saturera l'enzyme.

2.2) Drogues utilisées

Le Vérapamil (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur ou bloqueur des canaux CaVs, de la famille des phénylalkylamines. Il a été repris dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) à la concentration de 10 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à une concentration de 10 µM.

Le Diltiazem (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur ou bloqueur des canaux CaVs, de la famille des Benzodiazépines. Il a été repris dans du DMSO à la concentration de 10 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à une concentration de 10 µM.

La Nifédipine (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur ou bloqueur des canaux CaVs, de la famille des dihydropyridines. Il a été repris dans du DMSO à la concentration de 10 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à une concentration de 10 μ M.

Le Bayk 8644(Sigma-Aldrich, France) est un activateur des canaux CaVs de type L, de la famille des dihydropyridines. Il a été repris dans du DMSO à la concentration de 10 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à 10 μ M ou appliqué en patch-clamp à une concentration de 50 μ M.

La forskoline (FSK) est un activateur de l'adénylate cyclase (AC) (Sigma Aldrich, France) et a été repris dans du DMSO à la concentration de 100 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules ou appliqué en patch-clamp à une concentration de 10 μ M.

L'isoprénaline (ISO) (Sigma-Aldrich, France) est un activateur des récepteurs β 2-adrénergiques exprimés par les cellules HEK293T, ce qui permet une production endogène d'AMPC, car ces récepteurs sont couplés à une protéine Gas activatrice de l'AC. L'ISO a été repris dans de l'eau dé-ionisée et utilisé à la concentration de 100 nM.

Le CI-1044 ou ((R)-N-[9-amino-3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-1-phenylpyrrolo[3,2,1-j,k][1,4]benzodiazepin-3-yl]-3-pyridinecarboxamide) (Drug Safety R&D Pfizer, Amboise, France) nous a été donné par Stephan Chevalier. C'est un inhibiteur spécifique de la phosphodiesterase 4 (PDE4) dont l' IC_{50} est $0,5 \pm 0,2 \mu$ M n'a pas d'effet détectable pour les PDE 1, PDE 3, PDE 5 et PDE 7. Il n'existe pas de sélectivité pour les sous-types de PDE4. Il permet d'augmenter la concentration intracytoplasmique en AMPC. Le CI-1044 a été repris dans du DMSO à la concentration de 100 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules ou appliqué en patch-clamp à une concentration de 100 μ M.

L'apamine (Sigma, France) est une toxine, isolée à partir de venin d'abeille, spécifique des SKCa. Elle agit en bloquant le pore empêchant ainsi la sortie de K^+ et donc l'hyperpolarisation induite par les SKCa. Elle présente une affinité plus forte pour SK2> SK3> SK1.

Le KBR7943 (Sigma-Aldrich, France) est un bloqueur des échangeurs Na^+ / Ca^{2+} , dans leur mode reverse (sortie de trois ions Na^+ pour une entrée d'un ion Ca^{2+}). Il a été repris dans du DMSO à la concentration de 30 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à une concentration finale de 10 μ M.

Le SEA0400 (Cliniscience) est un bloqueur des échangeurs Na^+ / Ca^{2+} dans leurs deux modes de fonctionnement (mode normal et reverse). Il a été repris dans du DMSO à la concentration de 10 mM puis dilué dans le milieu de culture avant traitement des cellules à une concentration finale de 10 μ M.

III). Etude de l'expression des protéines par la technique du Western-Blot

3.1) Extraction et dosage des protéines totales

Les cellules sont cultivées en flacons de 75 cm² et sont décollées avec de la trypsine-EDTA. Puis ces cellules récoltées sont lavées dans du PBS avec Ca²⁺ et centrifugées 5 minutes à 1000xg. Elles peuvent alors être lysées avec 100µL de la solution de tampon de lyse ou stockées à -20°C pour une manipulation ultérieure. Une autre façon de procéder est de directement déposer 300µL du tampon de lyse sur le tapis cellulaire dans le flacon de culture de 75 cm², puis de gratter ce tapis avec un râteau de façon à recueillir les cellules lysées avec le tampon. Ce tampon est constitué de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 5% final, de PBS avec Ca²⁺ et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, France). Les extraits sont ensuite passés dans des seringues Microlance® avec des aiguilles d'un diamètre de 0.4 mm permettant par des mouvements d'aspirations et de refoulements de casser l'ADN génomique et diminuer la viscosité de l'échantillon. Toutes les étapes permettant la réalisation du recueil ainsi que la lyse des cellules doivent être faites sur glace afin d'éviter la dénaturation des échantillons. Le dosage des protéines lysées s'effectue grâce à un test colorimétrique basé sur la réduction des ions Cu²⁺ en ions Cu⁺ par liaisons peptidiques des protéines BC Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA). Le BCA va chélater les ions Cu²⁺ donnant ainsi une coloration violette. Une densité optique (DO), mesurée à la λ de 562 nm, pour chaque condition et les valeurs données sont proportionnelles à la concentration en protéines dans l'extrait cellulaire échantillonné. La quantification des protéines est calculée par mesure de l'absorbance en présence d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions avec des concentrations croissantes d'albumine (de 125 µg/mL à 2000 µg/mL).

3.2) Technique du Western-Blot

Cette technique consiste à réaliser une séparation des protéines d'un échantillon par électrophorèse puis après transfert des protéines sur une membrane, les protéines d'intérêts sont reconnues à l'aide d'anticorps spécifiques. Les extraits protéiques préparés sont placés en condition dénaturante pendant 4 heures à 0°C et en présence de bleu réducteur contenant du Tris, glycérol, SDS, bleu de bromophénol et de β -mercaptoéthanol (Tableau 11). La composition des gels d'électrophorèse et des solutions sont présentées dans les tableaux 11 et 12. Pour notre étude, nous avons utilisé des gels de 7 à 10% d'acrylamide afin d'étudier des protéines situées entre 75 kDa et 250 kDa. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel

et la migration des protéines est faite à voltage constant. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PolyVinylidèneFluoride (PVDF) dans du tampon de transfert dont la composition est décrite dans le tableau 11.

Tableau 11 : **Composition des différents tampons préparés pour l'utilisation en Western-blot.**

Solution (Volume final)	Composition	Quantité	pH
Tampon de lyse (2mL)	SDS 5% (Solution mère à 20%) PBS avec Ca ²⁺ Inhibiteurs de Protéases (10x)	500µL 1,3mL 200µL	-
Tampon de charge Laemmli (35mL)	Glycérol 20% β-mercaptoéthanol 10% SDS 4,6% Bleu de bromophénol Eau mQ	8mL 4mL 18,4mL Quelques cristaux 4,6mL	-
Tampon d'électrophorèse 10X (1L)	Tris Base Glycine SDS	30,2g 144g 10g	8,3
Tampon de transfert 5X (1L) Sans MeOh	Tris Base Glycine	18,75g 90g	8,3
Tampon de lavage T-TBS (1L) 10X	Tris Base NaCl Tween 20	6g 43,5g 5mL	7,4
Solution M de migration de Tris (200mL)	TRIS SDS	72.6g 1,6g	8,8
Solution C de concentration de Tris (200mL)	TRIS SDS	12g 0,8g	6,8

Tableau 12 : **Composition des gels d'électrophorèse lors de l'étape de migration du Western-blot.**

Gel en %	Gel de Migration (M)	Gel de Concentration (C) à 5%
7%	16,65mL d'H ₂ O 5,25mL d'acrylamide 40% 7,5mL de M Tris (pH 8,8) 300µL de SDS 10% 300µL d'ammonium-persulfate (APS) 10% 21µL de Temed	7,25mL d'H ₂ O 1,25mL d'acrylamide 40% 1,25mL de C Tris (pH 6,8) 100µL de SDS 10% 100µL APS 10% 10µL Temed
10%	14,4mL d'H ₂ O 7,5mL d'acrylamide 40% 7,5mL de M Tris (pH 8,8) 300µL de SDS 10% 300µL d'ammonium-persulfate (APS) 10% 12µL de Temed	7,25mL d'H ₂ O 1,25mL d'acrylamide 40% 1,25mL de C Tris (pH 6,8) 100µL de SDS 10% 100µL APS 10% 10µL Temed

Les protéines vont ensuite être transférées du gel sur la membrane selon leurs charges, en 1 heure et 30 minutes avec un ampérage imposé de 340 mA.

3.3) Révélation

Une fois les protéines transférées du gel sur la membrane PVDF, la membrane est rincée avec du tampon de lavage T-TBS 0,1% (Tween20® Tris Buffered Saline). Le méthanol est ainsi éliminé grâce au Tween 20® (Sigma, France). La membrane est ensuite plongée dans du rouge ponceau (Sigma, France) afin de visualiser les protéines et de pouvoir déterminer si les protéines ont bien été transférées sur cette membrane. La membrane est ensuite rincée et incubée dans du TBS avec 5% de lait pour saturer les sites non spécifiques aux anticorps pendant 2 heures. Pour l'étude des protéines d'intérêts, les anticorps primaires utilisés sont dilués dans du lait à 2% de Tween Tris Buffer Saline (TTBS) 0,1% et les anticorps secondaires sont dilués dans du 1% de tampon Tween Tris Buffer Saline (TTBS) 0,1%. Ces anticorps primaires sont : l'anticorps HA souris (1/500^{ème}, F-7 ; sc-7392 ; Santa Cruz, USA) produit chez la souris, un anticorps anti- β actin (1/10000^{ème}, A5441, Sigma-Aldrich, USA), un anti-Hsc70 (1/30000^{ème}, Tebu-bio, France) et un anti-Hsp90 (1/500^{ème}, sc-1057, Santa-Cruz Biotech, USA) issus tous trois de la souris. L'anticorps anti-CaV1.3 extracellulaire (1/200^{ème}, ACC-311, Alomone, Jérusalem) et l'anticorps reconnaissant la partie C-terminale du CaV1.3 (1/250^{ème}, HPA020215, Sigma-Aldrich, USA) produits tous deux chez le lapin. Les anticorps secondaires couplés à la Horse Radish Peroxydase (HRP) utilisés sont : un anti-lapin (1/3000^{ème}, goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004, Santa Cruz, USA) couplés à la HRP et un anticorps anti-souris (1/3000^{ème}, Southern Biotechnologies, USA) tous deux produits chez la chèvre. L'anticorps dirigé contre la protéine SK3 cible le motif hémagglutinine (HA) de la partie N-terminale intracellulaire de la protéine. Lors de la révélation, un kit de chimiluminescence (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific, France) est utilisé permettant de mettre en présence le luminol avec la HRP, ce qui va déclencher une réaction de peroxydation, pour obtenir une émission de photons, qui vont venir impressionner des films photographiques (Kodak, BiomaxLightfilm, USA) ou être détectables avec un imageur (DNR Bio Imaging modèle MF-ChemiBis 3,2).

3.4) Fractions protéiques des radeaux lipidiques

Les cellules sont cultivées en flacons de 75 cm², deux flacons à 80% de confluence sont nécessaires à l'expérimentation. Les cellules sont ainsi récoltées et lysées, comme expliqué dans la partie 3.1 précédente. Le lysat cellulaire recueilli, un volume de 850 μ L est déposé dans un tube d'ultra centrifugation de 5mL (Ultra Clear™ Tubes, Réf 344057, BECKMAN,

Thermo Electron), puis est mélangé avec un volume identique d'une solution de saccharose 90%. Ce mélange est ensuite vortexé à 220xg. Une solution de saccharose à 35% de 1,7mL est ajoutée délicatement par-dessus la première mixée au lysat à l'aide d'une aiguille de 21G. Puis de la même façon, 1,7mL de solution de saccharose à 5% est également déposé dans le tube sur la deuxième solution à 35% (Tableau 13 et 14). Les tubes de chaque lysat cellulaire sont pesés pour procéder à l'équilibrage de ces tubes. L'ultracentrifugation, par ultracentrifugeuse (Optima Max XP (réf 393315, BECKMAN, Thermo Electron)) avec un rotor MLS-50 (réf 367279, BECKMAN, Thermo Electron), est effectuée à 260.000xg pendant 6 heures à 4°C. La séparation des fractions lipidiques se fait en fonction de la densité de chacune. Les radeaux lipidiques étant plus riches en cholestérol, leur densité est assez faible ce qui les fait migrer de façon intermédiaire entre les solutions à 5% et 35% de saccharose. Une fois la centrifugation arrêtée, les tubes sont aliquotés en dix fractions de 500µL en prélevant au fond des tubes de 5mL. Les fractions comportant les nanodomains riches en cholestérol sont dans les dernières fractions comprises entre six et dix. Les fractions sont ensuite dosées comme décrit précédemment en partie 3.1 et seront déposées sur gel d'électrophorèse en Western-Blot.

Tableau 13 : **Composition des solutions pour le fractionnement protéique.**

Solutions au tampon de saccharose	Composition des solutions
Na₂CO₃ 500mM	13,25g dans 250mL d'eau distillée (pH 11)
EDTA 50mM	0,37g dans 20mL d'eau distillée
Na₂CO₃ 1,5M	15,9g pour 100mL d'eau distillée
MBS 10X	4,88d de MES (25mM) 8,7g de NaCl (150mM) 40µL de solution d'EDTA à 50mM (2mM) Ajuster à 100mL avec de l'eau distillée

Tableau 14 : **Composition du gradient de saccharose pour le fractionnement protéique.**

Concentration de saccharose	90	35	5
MBS 10X (mL)	5	5	5
Volume d'eau (mL)	10	15	25
Na₂Co₃ (1,5M) (mL)	0	8,3	8,3
Saccharose (g)	45	17,5	2,5

IV). Etude de la localisation de protéines d'intérêts par marquage et analyse en microscopie confocale

La veille de l'analyse en microscopie confocale, 20.000 cellules dans 1mL de milieu de culture sont déposées dans chaque puits d'une lame Lab-tek® (Chamber slide™, référence 154526, Nunc –ThermoFisher, USA). Le jour de la préparation des cellules, elles sont rincées avec du PBS avec Ca^{2+} et fixées par une solution de formaldéhyde à 4% pendant 15 minutes à température ambiante, sans agitation. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec du PBS avec Ca^{2+} et avec de la glycine à 100 mM, qui va permettre d'éliminer le restant de formaldéhyde des puits. Puis, les cellules sont perméabilisées avec une solution de Triton à 0,1% et incubées 10 minutes à température ambiante sous agitation. Une étape de saturation des sites non spécifiques est effectuée en incubant les cellules pendant 30 minutes dans une solution de PBS avec Ca^{2+} et BSA à 3%. Les cellules sont ensuite rincées et les anticorps primaire dilués au 1/200^{ème}, dans du tampon de marquage (PBS avec Ca^{2+} , BSA 4% et Azide 0,1%), sont déposés dans chacun des puits. Les Labtek® sont incubées 1 heure à température ambiante sous agitation. Les puits sont ensuite rincés avec 800µL de solution de rinçage avec Glycine 100 mM. Les anticorps secondaires utilisés sont soit l'Alexa fluor anti-lapin souris couplé au fluorochrome AlexaFluor® 488 (InvitrogenMolecular Probes, A11001), dilué au 1/500^{ème} dans du tampon de marquage (PBS avec Ca^{2+} , BSA 4% et Azide 0,1%), soit le Texas red anti-lapin au fluorochrome AlexaFluor® 647 (InvitrogenMolecular Probes, A21244), dilué au 1/500^{ème} dans du tampon de marquage. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante sous agitation, les puits sont ensuite lavés avec 800µL de solution de rinçage avec glycine 100mM. L'analyse des préparations a été réalisée en collaboration avec Julien Burlaud-Gaillard de la plateforme R.I.O. de microscopie électronique, de l'Université François Rabelais de Tours.

V). Biologie Moléculaire

5.1) Vecteurs d'expression

5.1.1 Préparation des plasmides

Les plasmides utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le tableau 15 suivant.

Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés.

Nom plasmide	Résistance Bactéries	Sélection	GFP±
pTracer-rSK3	Ampicilline	Zéocin	+
pTracer-rSK3 285A	Ampicilline	Zéocin	+
536pPRIPu-hSK3	Ampicilline	Puromycine	-
536pPRIPu-hSK3-HA-N-term	Ampicilline	Puromycine	-
536pPRIPu-hSK3-HA-N-term S289A	Ampicilline	Puromycine	-
536pPRIPu-hSK3-HA-N-term S289A-S197A	Ampicilline	Puromycine	-
536pPRIPu-hSK3-HA-N-term S289A-S197A-S172A	Ampicilline	Puromycine	-
536pPRIPu-hSK3-HA-N-term S289A-S197A-S172A-S133A	Ampicilline	Puromycine	-

Le plasmide pTracer-rSK3, nous a été donné par le Dr Lidofsky, Université du Vermont, USA. C'est un plasmide d'expression contenant l'ADNc pour la GFP (Green Fluorescent Protein) et le canal SK3 de rat, contrôlés par des promoteurs viraux distincts. Ce plasmide a été introduit de façon stable dans les HEK293T au laboratoire à l'aide d'une pression de sélection réalisée avec de la zéocin pour créer la lignée HEK293T-rSK3.

Les plasmides 536pPRIPu-hSK3-HA-N-term et 536pPRIPu-hSK3 (Figure 25) ont été élaborés par l'équipe du Dr Soriani (CNRS UMR 7277, Nice Sophia Antipolis). Ces constructions contiennent le canal SK3 humain et pour la construction 536pPRIPu-hSK3-HA-N-term un motif d'hémagglutinine (HA) a été ajouté sur l'extrémité N-terminale de la protéine. Les autres constructions présentées dans le tableau 15 ont été obtenues lors d'expérimentations en mutagenèse dirigée présentées en partie 5.2.

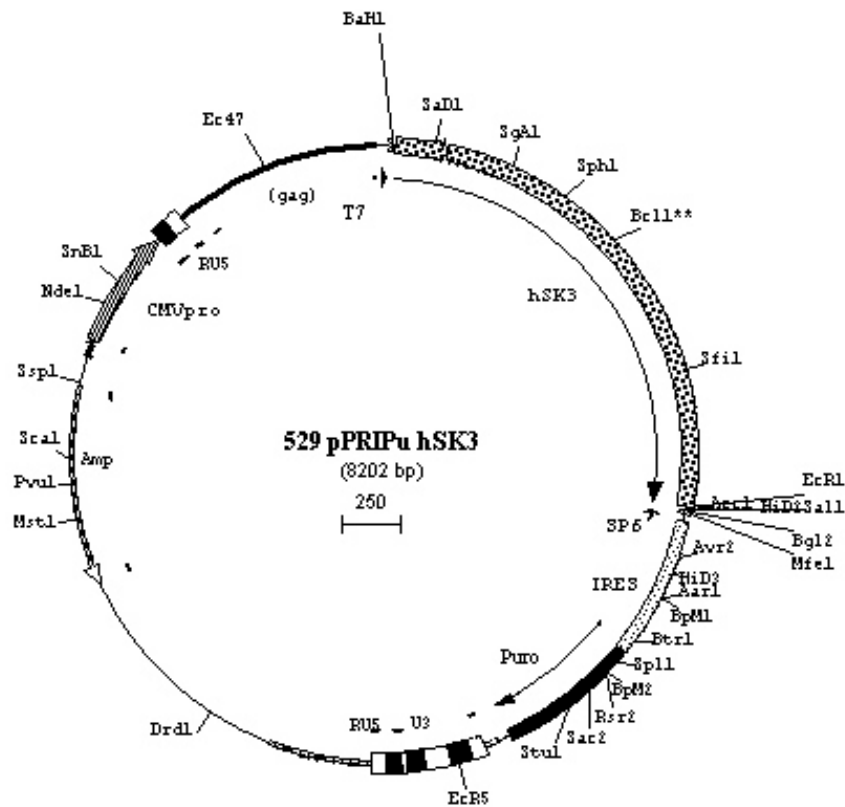


Figure 25: **Représentation de la construction 536pPRIPu-hSK3.**

8202 paires de bases composent cette construction et tous les sites des enzymes de restriction ainsi que les domaines IRES et du gène de résistance à la Puromycine sont présentés.

5.1.2 Conception des amorces

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) requiert l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques, pour que ce couple puisse venir s'hybrider sur la séquence d'ADN à amplifier. La qualité de l'hybridation dépend de la quantité et de la qualité des amorces utilisées. Le choix des amorces doit être réalisé selon les conditions suivantes : La longueur des amorces doit être comprise entre 25 et 45 pb (paire de base), la mutation doit se situer au milieu de l'amorce avec 10-15 pb à chaque extrémité. Enfin, le pourcentage de GC (liaison Guanine-Cytosine) doit être supérieur à 40% et le T_m (température de fusion) de chaque amorce doit être supérieur ou égale à 78°C. Les séquences des amorces pour chacune des constructions, ou étapes amenant à la construction avec les quatre mutations des résidus sérine de la protéine SK3, sont reportées dans le tableau 16. Le calcul du T_m (melting temperature) se fait en tenant compte de la longueur du primer en bases (N = 37) et des valeurs en pourcentage des bases GC (% GC + 48,6). La relation est la suivante :

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - (675 / N) - \% \text{ mismatch} = 77,49$$

Tableau 16 : Séquences des amorces des différentes constructions avec les protéines rSK3 et hSK3 des constructions utilisées.

(S : sens ; AS : anti-sens ; GC : liaison Guanine-Cytosine ; Tm : Température de fusion).

Nom amorce	Séquence (5' – 3')	Tm (°C)	GC %
Mutation SER285 rSK3	S GAGAAAGCGACTGGCTGACTATGCTCTGATTTTTGGG	77,49	48,6
	AS CCCAAAAATCAGAGCATAGTCAGCCAGTCGCTTTCTC		
Mutation SER197 hSK3	S CTCAGCCGCCTCGCCGCCTCCCGGAGG	89,1	81,4
	AS CCTCCGGGAGGCGGCGAGGCGGCTGAG		
Mutation SER172 hSK3	S CACCGGCGGGACGCCAACCCTTCACG	87,7	74
	AS CGTGAAGGGGTTGGCGTCCCGCCGGTG		
Mutation SER133 hSK3	S CTCCAGGCAAGGCGCCAGCTCAATCTCAATGACCAC	86,9	59,4
	AS GTGGTCATTGAGATTGAGCTGGGCGCCTTGCCTGGAG		

5.2) Mutagenèse dirigée

L'objectif de ces expérimentations a été de substituer un résidu sérine (AGT) de la protéine SK3 avec un résidu alanine (CGX) à l'aide du kit «QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit» (Agilent, USA). La méthode consiste à réaliser une réaction de PCR sur différentes constructions comprenant la protéine SK3, à l'aide d'une ADN polymérase haute-fidélité (pfuUltra HF) et d'une paire d'amorces, contenant la mutation désirée. La PCR est réalisée avec 10 ng d'ADN plasmidique qui sont déposés dans un tube thermosensible (permettant le chauffage homogène dans tout le tube) et ce tube contient le tampon de PCR 10x (5µL). 125 ng de chaque primer sont également ajoutés, correspondant à 1,1µL, ainsi qu'1µl de mix de nucléotides dNTP (dCTP, dGTP, dATP et dTTP). 3µL de la solution de QuickSolution sont aussi ajoutés, permettant d'améliorer la polymérisation de l'ADN, à l'aide de 1µL de DNA polymérase *PfuUltraHF* (2,5U/µL). Cette polymérase est une polymérase à ADN présentant un haut degré de fidélité (HF : High Fidelity).

Le cycle de PCR se déroule de la façon suivante :

- 95°C pendant 1 min
- 95°C pendant 50 s
- 60°C pendant 50 s
- 68°C pendant (1min/kb de plasmide) (8 min 24s rSK3 / 8 min 12s hSK3)
- 68°C pendant 7 min

Les produits de PCR ainsi obtenus sont ensuite refroidis sur glace pendant 2 min, avant d'être digérés pendant une heure à 37°C avec l'enzyme Dpn I. Cette enzyme permet d'éliminer l'ADN plasmidique parental du produit d'amplification qui cible uniquement l'ADN méthylé. L'ADN plasmidique non muté, produit dans les bactéries, est très méthylé, ce qui n'est pas le cas de l'ADN muté produit lors de la réaction de PCR. De cette façon la séquence d'ADN amplifiée et mutée obtenue est la plus pure possible. L'intégrité du plasmide est ensuite vérifiée en faisant migrer ce plasmide avec du tampon de charge (BlueOrange®, Promega, USA) dans un gel de 1% d'agarose contenant du BET (bromure d'éthidium). La séquence nucléotidique des plasmides a été validée par Moreau A., au laboratoire UMR 966 de Tours.

5.3) Amplification et purification des plasmides

5.3.1 Transformation bactérienne

Les plasmides doivent être amplifiés pour pouvoir avoir une quantité suffisante permettant de réaliser les transfections des cellules voulues. Tout d'abord, les plasmides sont transférés dans des bactéries compétentes, pouvant recevoir ces plasmides. Les bactéries utilisées sont celles de la souche XL GOLD Ultra Compétentes (Machery-Nagel, France). 45µL de bactéries sont décongelés sur glace avec 2µL de β-mercaptoéthanol, puis les bactéries sont incubées pendant 10 minutes sur glace. Ensuite, 1µL de plasmide (équivalant généralement à 10 ng de plasmide) est ajouté aux bactéries puis incubé durant 30 minutes sur glace. Enfin, un choc thermique à 42°C, avec un bain marie pendant 45 secondes, puis un refroidissement sur glace de 2 minutes, afin de figer à nouveau la membrane des bactéries, sont réalisés. Les bactéries sont ensuite mises dans 500µL de milieu SOC (Invitrogen, France), permettant d'optimiser la réparation des membranes des bactéries après le choc thermique, puis incubées pendant 1h à 37°C sous agitation (225 rpm). Des volumes de 50µL et de 200µL sont prélevés et déposés sur boîte de pétri contenant du milieu LB-agar (20g/L de LB et 12g/L d'agar) et l'antibiotique de sélection (Ampicilline). Ces deux volumes distincts permettent d'optimiser le rendement du développement des colonies des bactéries transformées sur les boîtes de pétri.

5.3.2 Amplification bactérienne

Les boîtes de pétri sont placées dans les incubateurs, face inversée, durant la nuit, à 37°C. Les colonies ayant poussées durant ce laps de temps sont prélevées avec un cône puis déposées dans un tube de polypropylène de 10mL avec 5mL de milieu de LB Broth contenant

l'antibiotique de sélection pendant 6 heures à 37°C et à 225 rpm. Cette préculture de bactéries transformées est ensuite mise dans 100mL de LB Broth pour amplifier les bactéries et obtenir une masse assez importante de bactéries pour leurs purifications. Cette culture est faite durant la nuit, à 37°C sous agitation à 225 rpm également.

5.3.3 Purification des plasmides

Les bactéries sont ensuite récoltées et l'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Le principe du kit repose sur le fait que l'ADN soit chargé négativement, ce qui lui permet d'être retenu par la colonne échangeuse d'ions fournie par le kit. Les bactéries sont centrifugées et le culot de bactéries est repris dans un tampon de suspension, contenant de l'ARNase A, permettant d'homogénéiser la suspension et d'éliminer l'ARN bactérien contaminant. La lyse des bactéries est réalisée avec un second tampon contenant du SDS. Cette lyse est arrêtée grâce à un tampon de neutralisation qui sert ici également à faire précipiter les protéines et l'ADN chromosomique bactérien. La phase liquide, contenant l'ADN plasmidien, est ensuite déposée dans une colonne d'extraction pour recueillir l'ADN plasmidien. Cette colonne échangeuse d'anions est tout d'abord équilibrée avec une solution afin d'être chargée positivement. La phase liquide est chargée sur cette colonne et est ensuite rincée pour permettre d'ôter toute trace éventuelle de tampons précédents et ainsi d'optimiser la pureté de l'ADN. Une solution d'élution, contenant des molécules chargées positivement, est chargée dans la colonne afin que cette solution entraîne l'ADN plasmidique. L'ADN élué est ensuite précipité avec une solution d'isopropanol, permettant la séparation de l'ADN plasmidique de la phase aqueuse de l'éluât par précipitation. Ensuite, l'ADN plasmidique est centrifugé à 5000xg pendant 5 min, puis de l'éthanol 70% est déposé sur le culot pour laver l'ADN. Le culot est ensuite séché à température ambiante pour éliminer les traces résiduelles d'éthanol et une fois sec, le culot d'ADN est repris dans de l'eau stérile DNase-free. Les plasmides ainsi purifiés sont dosés par spectrophotométrie. La DO (densité optique) à 260 nm permet de déterminer la concentration de la solution (1 DO = 50µg/mL d'ADN). Les ratios à 280/260 nm et à 230/260 nm renseignent respectivement sur la contamination protéique et sur la contamination au solvant (les rapports devant être supérieurs ou égaux à 1,7). Leur pureté peut être aussi contrôlée sur gel d'agarose 1% en électrophorèse contenant du BET. Ces plasmides validés vont ensuite pouvoir être utilisés pour réaliser des transfections transitoires ou stables au sein des cellules étudiées.

VI). Transfection de lignées cellulaires

6.1) siRNA: « Small interfering RNA »

Les séquences siRNA (small interfering RNA) sont utilisées pour permettre d'invalider, de supprimer l'expression de protéines spécifiques étudiées. De la lipofectamine RNAimax® (Invitrogen, France), permettant la formation de liposome, est utilisée pour permettre aux siRNA de ce complexer avec et ainsi de pouvoir être incorporé par la membrane plasmique des cellules par endocytose. La lipofectamine RNAimax® est incubée avec le siRNA dans du milieu Opti-MEM sans sérum. Un ratio de 5µL de Lipofectamine pour 20pmoles de siRNA est appliqué. Dans une plaque compagnon de six puits, 400.000 cellules/puits sontensemencées dans du milieu avec sérum le premier jour. Le lendemain, le milieu est remplacé par 1,5mL de milieu frais. Puis, dans un tube éppendorf, 500µL de milieu Opti-MEM sans sérum sont déposés avec 5µL de Lipofectamine RNAimax® et 20pmoles de siRNA. Une incubation est faite de 20 minutes, puis les 500µL sont déposés au goutte-à-goutte sur les cellules de l'un des puits de la plaque compagnon de 6 puits. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 à 6 heures, puis 1 mL de milieu frais avec sérum est ajouté afin de les maintenir en culture pendant 24 à 72 h. L'efficacité de l'extinction des protéines est contrôlée par RT-qPCR et par western blot. Un siRNA, dont la séquence n'est complémentaire d'aucun ARNm connu, est utilisé comme contrôle négatif. Les siRNAs utilisés durant ces travaux de thèse sont lessiRNA α 1D#1s (sc-42690, Santa Cruz Biotech) qui est un mélange de trois séquences : 5'-CCAUCUCCGUUGUGAAGAUtt-3' ; 5'-CCAUGGACAUUCUGAACAUtt-3' et 5'-CCAUCGGUCUAGCAUAUCAAtt-3' ; et siRNA α 1D#2 : 5'-GAACUCUUCGCUUUCGAAAtt-3'. Nous avons aussi utilisé un siRNA contre les transcrits codant pour les canaux SK3 (5'-GAAAGCGACUGAGUGACUAdTdT-3').

6.2) Surexpression transitoire

Afin de transférer les cellules HEK293T avec le plasmide pTracer rSK3-S285A, ce plasmide est complexé à la Lipofectamine 2000® (Invitrogen, France,) dans du milieu sans sérum (Optimem ; 100µL par puits de plaque 6 puits). Les volumes de milieux et les quantités de plasmides sont adaptés en fonction du nombre de cellules à transférer. Par exemple, 3µL de Lipofectamine LTX® sont utilisés pour transférer 1µg d'ADN de plasmide pTracer rSK3-S285A dans 500.000 cellules, ce qui correspond à un puits de plaque 6 puits. Le plasmide est ensuite mis en présence des cellules pendant 48 h dans le milieu de culture en présence de sérum. Les cellules émettant une fluorescence verte (cellules transfectées exprimant la GFP et

le canal d'intérêt) montrent le rendement de la transfection. Suite à ces modifications d'expression, les cellules sont soumises à des tests fonctionnels de patch-clamp.

6.3) Transfections stables

Les plasmides 536pPRIPu-hSK3-HA-N-term et 536pPRIPu-hSK3-HA-N-term mutés S289A-S197A-S172A-S133A, après avoir été testés et validés en séquençage, ont été transfectés dans les cellules HEK293T. Ces plasmides ne contiennent pas de séquence luciférase ou GFP et donc l'évaluation de l'efficacité de la transfection est seulement possible grâce au gène de résistance à l'antibiotique, la puromycine. Afin de transfecter ces plasmides, les cellules ont été implantées la veille de la transfection à 300.000 cellules par puits dans une plaque compagneon 6 puits. Le lendemain, les plasmides contenant la protéine SK3 humaine avec le motif HA mutée ou non mutée ont été transfectés dans les cellules en utilisant du milieu Opti-MEM sans sérum également comme décrit précédemment en partie 6.1. Différentes concentrations de plasmide ont été testées afin d'augmenter la proportion de cellules transfectées et la transfection en parallèle d'un plasmide de taille similaire mais contenant la GFP a permis d'évaluer l'efficacité des transfusions. De la Lipofectamine 2000® est utilisée comme transfectant et appliquée à raison de 3µL de Lipofectamine par 1µg d'ADN plasmidique dans 300µL d'Opti-MEM sans sérum. Une incubation de 6 heures à l'incubateur est réalisée avec les cellules et le produit de transfection, puis le milieu est ôté et 2ml de milieu DMEM avec 5% de sérum sont ajoutés aux cellules. 48 heures après, un traitement avec 1mg/mL de puromycine est appliqué durant une semaine, puis de 0,5mg/mL pendant la semaine suivante. Cet antibiotique permet d'obtenir la sélection des cellules transfectées avec le plasmide d'intérêt en éliminant toutes celles qui n'ont pas intégré le gène de résistance à cet antibiotique et par conséquent le plasmide voulu. Les cellules sont amplifiées sans traitement avec l'antibiotique de sélection, puis congelées de façon à constituer un stock de cellules transfectées pour des manipulations futures. Les cellules sont testées par la suite sans traitement avec antibiotique en test fonctionnel de patch-clamp.

VII). Etudes des courants ioniques SK3 et CaV1.3 par la technique de Patch-Clamp

7.1) Principe du Patch-clamp

Cette technique permet d'enregistrer des courants ioniques micros-ou macroscopiques de cellule unique. Le principe est d'approcher une pipette en verre, dont la pointe a un diamètre de l'ordre du micromètre, sur la surface de la cellule. Le contact de la pipette avec la membrane plasmique de la cellule va se créer grâce aux propriétés d'adhérence entre le verre et la bicouche lipidique. Ce contact physique est appelé « Seal » et le bout de membrane alors isolé par la pipette est appelé « Patch ». Suite à une pression négative appliquée dans la pipette. La résistance de la pointe de la pipette augmente jusqu'à obtenir une résistance d'au moins 1 giga Ohm, on parle alors de giga Seal (Hamill *et al.*, 1981). La pipette contient un milieu intrapipette (MIP) et fait office d'électrode de stimulation et d'enregistrement. Les solutions de MIP et du bain (extracellulaire) ont des compositions connues et contrôlées (voir tableau 17 ci-après). La pipette est reliée à l'amplificateur (Axon Instruments, USA) comme l'électrode de référence permettant de fermer le circuit électrique. L'amplificateur, qui assure la conversion courant-tension est lui-même relié à une carte analogique-numérique (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) assurant la conversion d'un signal analogique en un signal numérique mesurable et analysable par ordinateur. Le contrôle du voltage ainsi que l'enregistrement et le suivi des courants sont pilotés grâce au logiciel Clampex (PCLamp 8.1, Axon Instruments, USA). L'analyse des résultats a été réalisée en utilisant les logiciels Clampfit (PCLamp 8.1, Axon Instruments, USA) et Origin 8.5 (Microcal Software, USA). Cette technique permet de mesurer les courants ioniques générés au travers de la membrane plasmique par les canaux ioniques pour des potentiels de membrane variables et imposés.

7.2) Installation de Patch-clamp

L'installation de patch-clamp (Figure 26) est composée d'un microscope inversé (Nikon Eclipse, TE2000-U, Nikon, Japon), sur lequel peuvent être placées des boîtes de culture contenant les cellules. Une tête de perfusion est ajoutée d'un côté du microscope, tandis que de l'autre côté une tête d'amplificateur (CV 203 BU Headstage, Axon Instruments, USA) est fixée, servant à imposer le voltage et à enregistrer les courants ioniques des cellules. Cet amplificateur va permettre d'amplifier le signal et le filtrer afin d'avoir un signal analogique avec un minimum de bruits, numérisable ensuite à l'aide de la carte qui convertit

ce signal analogique en un signal numérique. L'amplificateur utilisé va amplifier le signal avec un gain, que nous avons choisi, compris entre x2 et x10 et filtré en utilisant des fréquences de filtration de 1 et 5 KHz pour le canal SK3 et de 5 KHz pour l'étude de la sous-unité $\alpha 1D$. La pipette de patch, raccordée à cette tête d'amplificateur, est approchée de la surface des cellules grâce à un micromanipulateur piézoélectrique (TS-5000-300, Burleigh, USA). Un fil d'argent chloruré est mis en contact avec le milieu extracellulaire des cellules, assurant ainsi la connexion électrique au système d'amplification et d'enregistrement. Un autre micromanipulateur hydraulique (MMN-1, Narishige, Japon) assure l'approche de la tête de périfusion au-dessus de la cellule. Un système d'électrovalves (Biologic-Sciences Instrument, MEV-9, USA), jusqu'à 8 perfusions connectées, permet à l'utilisateur de changer de solution perfusée. Ces éléments de l'installation sont mis sous cage de Faraday, qui est relié à la terre et permet ainsi d'isoler cette installation de tous bruits et interférences électriques parasites extérieures, de même que de relier à la terre les éléments présents sous cette cage. Pour finir, cette installation repose sur une table anti-vibrante afin de l'isoler de toutes vibrations mécaniques provenant des mouvements de l'utilisateur ou de l'environnement.

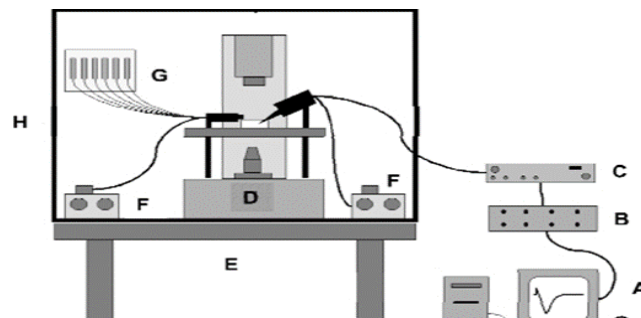


Figure 26 : Schéma de l'installation de patch-clamp.

(A : Ordinateur ; B : Carte de conversion analogique/numérique et numérique/analogique ; C : Amplificateur de patch clamp ; D : Microscope inversé ; E : Table anti-vibrante ; F : Micromanipulateurs ; G : Système de périfusion ; H : Cage de Faraday).

7.3) Approches et configurations utilisées

Les cellules sontensemencées au nombre de 15.000 à 20.000 cellules dans des boîtes de culture adaptées à la platine du microscope inversé (10 cm²). Cette technique de patch-clamp a été utilisée au cours de cette thèse en configuration whole-cell de patch rompu et de patch perforé, en mode voltage clamp et également en configuration whole-cell de patch rompu en mode current clamp. Les courants SK3 ont été étudiés dans les cellules embryonnaires rénales HEK293T rSK3, HEK293T rSK3 S285A, HEK293T hSK3, HEK293T hSK3 HA N-terminale, HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A, HEK293T hSK3 HA N-

terminale S289A-S197A-S172A-S289A et l'activité de la sous-unité $\alpha 1D$ dans les cellules cancéreuses coliques HCT-116. Pour les deux types cellulaires étudiés, les pipettes ont été faites à partir de verre de borosilicate (Harvard Apparatus, USA) de diamètre externe de 1,5 mm et avec un diamètre interne de 1,17 mm. Ces pipettes de verre ont été étirées grâce à deux types d'étireuses, une horizontale (P-97, Sutter Instrument Co., USA) et une verticale (Narishige, PC-10, Japon). Les résistances des pipettes ont été comprises entre 2 et 3 MOhm pour les cellules HEK293T et de 4 à 6 MOhm pour les HCT-116. Pour les études des courants SK3, un protocole de rampe ainsi qu'un protocole de créneaux de potentiel ont été utilisés pour l'étude de la régulation du canal SK3 par la voie AMPc-PKA. Pour l'étude de l'activité de la sous unité $\alpha 1D$ des cellules cancéreuses HCT-116, deux configurations de patch ont été utilisées : whole-cell de patch rompu et whole-cell de patch perforé. Le mode current clamp a également été utilisé pour les HCT-116. Pour obtenir la configuration du patch perforé, de l'amphotéricine B a été ajoutée dans la solution de pipette (voir la composition des solutions dans la partie 7.5.2).

7.4) Protocoles utilisés

Pour l'étude des courants SK3, un protocole de rampe (donnant directement la relation courant-potentiel ou relation I-V) consistant en une variation progressive du potentiel imposé (de +100 mV à -100 mV en 500 ms) à partir d'un potentiel de maintien (« Holding Potential » ou HP) de 0 mV toutes les 4 secondes a été utilisé. Ce protocole de rampe (Figure 27) nous a permis de mesurer l'amplitude des courants K^+ dans les différentes cellules HEK293T. Le HP de 0 mV permet d'inactiver certains courants endogènes dépendant du potentiel. Par ailleurs, puisque le potentiel d'équilibre pour les ions Cl^- (E_{Cl^-}) est à 0 mV, le courant enregistré à ce potentiel ne peut être lié à un courant Cl^- endogène. L'amplitude du courant SK3 a alors été mesurée à 0 mV afin de s'affranchir des courants chlorures. Un potentiel imposé, de +100 mV, en début de rampe permet de minimiser la réactivation des courants endogènes.

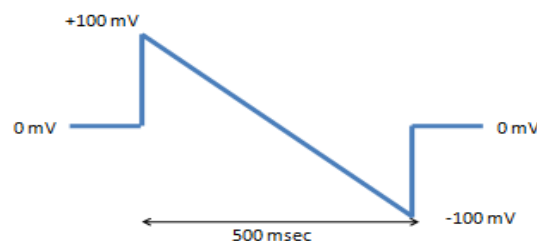


Figure 27: **Représentation du protocole de rampe appliqué aux cellules HEK293T lors des expérimentations de patch-clamp.**

Le protocole de rampe appliqué sur les cellules HEK293T, transfectées avec le canal SK3 de rat ou humain muté ou non, permet de mesurer l'activité des canaux SK3 sous l'action de modulateurs pharmacologiques, en faisant varier le potentiel de +100 mV à -100 mV en 500 ms.

L'étude s'est effectuée sur les cellules HCT-116 en appliquant un autre protocole (Figure 28) qui consiste en une succession de créneaux dépolarisants (« pulses ») d'une durée de 600 ms par échelon de 20 mV et pour des potentiels allant de -70 mV à +50 mV à partir d'un HP de -100 mV. Ce protocole de dépolarisations successives permet d'étudier, contrairement aux rampes, l'évolution de l'amplitude des courants en fonction du temps pour un potentiel imposé donné. La relation I-V est déterminée en mesurant l'amplitude du courant (par rapport à 0 pA) en fin de pulse (I) en fonction des potentiels imposés (V). En plus du mode voltage clamp, nous avons utilisé le mode current clamp qui consiste à mesurer le potentiel de membrane des cellules à $I = 0$. Il a été appliqué pour étudier si la protéine $\alpha 1D$ et l'échangeur NCX pouvaient moduler le potentiel de membrane des cellules HCT-116.

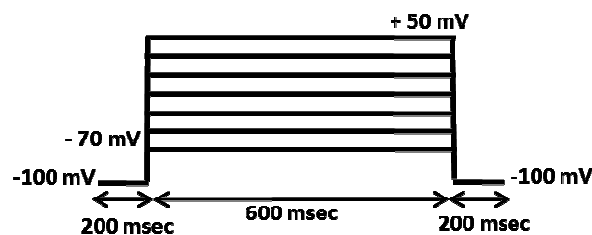


Figure 28 : **Représentation du protocole d'IV appliqué aux cellules HCT-116.** Il permet de mesurer l'activité de la protéine $\alpha 1D$ dans les HCT-116.

Pour chacun de ces protocoles utilisés, l'amplitude du courant est normalisée à la capacité membranaire de la cellule (pF) et les activités des canaux sont indiquées en densité de courant (pA/pF). La conductance membranaire (nS) pour les cellules avant et après application de traitement a été calculée par un ajustement linéaire des courants obtenus.

7.5) Solutions utilisées

7.5.1 Solution physiologique saline (PSS)

Cette solution est utilisée pour les expériences de patch-clamp et de mesure de Ca^{2+} cytosolique. Elle est préparée le jour même de la manipulation et à partir d'une solution mère concentrée 10 fois et congelée. Le pH (7,4) est contrôlé et ajusté avant chaque expérience. Le contenu des solutions de PSS, pour les différentes études électrophysiologiques, est présenté dans le tableau 17. Il s'agit de mimer le milieu extracellulaire, ce qui explique la forte concentration en Na^+ et la faible concentration en K^+ . Cette solution possède une concentration très proche de celle du PBS (différence principale avec les bicarbonates) dont nous avons parlé plus tôt, mais l'avantage de la préparer nous permet de contrôler totalement sa composition et de faire varier les concentrations en ions en fonction des canaux ioniques à étudier. L'osmolarité théorique du PSS est de 320 mOsm et est vérifiée à l'aide d'un osmomètre (Roebing, Allemagne).

7.5.2 Solutions de milieux intrapipette (MIP)

L'amphotéricine B a été utilisée dans la solution de MIP sans EGTA pour les études sur les HCT-116 en patch perforé. L'amphotéricine B a été dissoute dans du diméthylsulfoxyde (50mg/mL) et diluée jusqu'à une concentration finale de 0,15mg/mL dans le MIP. Lors de ces manipulations de patch perforé, l'amphotéricine a été ajoutée au MIP avant que les pipettes de verre ne soient remplies de solution de MIP. Les compositions des différentes solutions de MIP utilisées au cours de cette thèse sont présentées dans le tableau 17. Pour les études des courants SK3 ou CaV1.3, les solutions de MIP contiennent différentes concentrations libres de Ca²⁺ en fonction de la concentration d'EGTA ajoutée : pCa 6 pour SK3 et pCa 6 ou 7 pour les expérimentations en current-clamp sur les HCT-116 (Tableau 17).

Tableau 17 : **Compositions des solutions physiologiques de PSS et de MIP utilisées en patch-clamp.**

Ces solutions ont été utilisées pour les expériences de patch-clamp sur les cellules HEK293T et HCT-116 (pH : 7,4 /NaOH ; pH : 7,2 /KOH).

	HEK293T		HCT-116			
	Whole-cell		Whole-cell		Current clamp	
	MIP	PSS	MIP	PSS	MIP	MIP
	pCa	6	-	-	-	6
Composés	concentration en mM		concentration en mM			
CsCl	0	0	0	100	0	0
KCl	145	4	0	2,5	20	20
NaCl	0	140	0	0	0	0
MgCl ₂	1	1	3,5	0	1	1
Mg-ATP	1	0	0	0	1	1
CaCl ₂	0,87	2	0	0	0,87	0,37
EGTA	1	0	10	0	1	1
HEPES	10	10	10	10	10	10
NaH ₂ PO ₄ ⁻	0	0,33	0	0	0	0
D-Glucose	0	11,5	0	0	0	0
K-glutamate	0	0	0	0	125	125
BaCl ₂	0	0	0	20	0	0
TEACl	0	0	120	0	0	0
pH	7,2 (KOH)	7,4 (NaOH)	7,2 (NaOH)	7,4 (NaOH)	7,2 (KOH)	7,2 (KOH)

VIII). Migration et test de viabilité cellulaire

8.1) Migration cellulaire

8.1.1 Inserts de migration

La capacité des cellules à migrer, en réponse à des modulations par des molécules pharmacologiques ou suite à l'extinction de certaines protéines, est évaluée par l'utilisation d'inserts de migration BD (Becton Dickinson, France). Le fond des puits des inserts est tapissé d'une membrane de polyéthylène (PET) composée de pore d'un diamètre de $8\mu\text{m}$. Les cellules, pour venir coloniser l'autre côté de cette membrane, devront alors se déformer pour passer au travers de ces pores. Ces inserts de migration sont déposés dans des plaques de 24 puits (Multiwell stérile, Falcon®) adaptées. Les cellules HCT-116 sont ensemencées à une densité de 60.000 cellules dans $200\mu\text{L}$ de milieu Opti-MEM et avec 10% de sérum HyClone au niveau du compartiment supérieur. Dans le compartiment inférieur, $800\mu\text{L}$ de milieu Opti-MEM avec 10% de sérum HyClone sont également déposés (Figure 29).

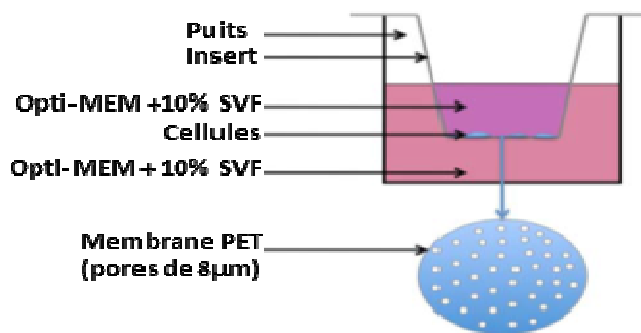


Figure 29: **Représentation schématique des inserts de migration.**

(d'après la thèse de R. Felix, 2010).

Il n'est pas nécessaire d'avoir un gradient de concentration en sérum entre les deux compartiments de l'insert pour que les cellules migrent. Les molécules testées sont appliquées à la même concentration dans les deux compartiments. Les cellules sont placées à l'incubateur durant 24 heures, puis les inserts sont rincés au PBS avec Ca^{2+} . Les cellules sont ensuite fixées dans du méthanol glacé 100% durant 10 minutes, puis une nouvelle fois rincées au PBS avec Ca^{2+} . Un nettoyage de l'intérieur de l'insert est procédé avec un coton-tige afin d'ôter toutes les cellules situées dans l'insert et qui n'ont pas migrées. Une fois nettoyés, les inserts sont plongés dans une solution de PBS avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (solution mère au 1 mg/ml) dilué au $1/5000^{\text{ème}}$ marquant le noyau des cellules. Une série de 9 photographies par insert est réalisée à l'objectif x10. Le comptage des cellules s'effectue sur les logiciels ImageJ et Mesurim. Le nombre moyen de cellules ayant migrées par condition et par insert est comparé au nombre moyen de cellules ayant migrées en condition contrôle. Chaque condition est réalisée en triplicata.

8.1.2 Recouvrement cellulaire après cicatrice (wound healing)

Les tests de cicatrisation (wound healing) consistent à étudier au cours du temps la capacité des cellules à venir coloniser, réparer une zone lésée du tapis cellulaire. Ces études ont été réalisées à partir d'une monocouche cellulaire confluyente sur plaque de culture 24 puits. Les lésions ont été faites avec une pointe stérile de 2 mm de largeur, ou grâce à des inserts de wound healing (Insert de culture 2 puits, IBIDI). Ces inserts vont permettre de définir une zone sans cellule entre deux compartiments de cellules, créant ainsi deux fronts de migration. Les cellules sont d'abord lavées au PBS avec Ca^{2+} , puis sont traitées ou non avec des bloqueurs pharmacologiques ou des siRNA. Des images de la zone lésée sont enregistrées toutes les heures pendant 12 h grâce à l'acquisition automatique effectuée sur un microscope Nikon (Eclipse ti), couplé à une caméra Nikon (DS Qi2). Ce système comprend une enceinte (Okolab, USA) contrôlant la température et les niveaux de CO_2 et d' O_2 . Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel NIS Element AR. La zone de blessure avant et après l'expérience a été mesurée et comparée par rapport aux puits témoins. L'analyse est faite sur la zone sans cellule et le pourcentage de recouvrement de cette zone par les cellules en fonction du temps est calculé et il correspond à la migration cellulaire.

8.2) Viabilité cellulaire (MTT)

Les molécules utilisées lors des expérimentations sont dans un premier temps testées sur la viabilité cellulaire pour s'assurer qu'elles ne comportent pas d'effet toxique. Le test du MTT (Sels de tétrazolium ou (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) est utilisé après application des bloqueurs pharmacologiques et siRNA pendant 24 h, ce qui correspond à la durée maximale des expériences de migration cellulaire. Le principe du test de MTT est que les cellules viables peuvent activer des enzymes dépendantes de la NADPH cytosolique. Ces enzymes vont ensuite réduire les sels de tétrazolium présents dans le réactif MTT en cristaux de formazan. Le DMSO va ensuite solubiliser ces cristaux de formazan et produire une coloration violette proportionnelle à la quantité de cellules viables. La densité optique est mesurée à 550 nm avec un spectrophotomètre. La densité optique est normalisée à la condition contrôle et les manipulations sont effectuées en triplicata.

IX). Mesure des variations de Ca^{2+} libre cytosolique

9.1) Solutions utilisées

Différentes solutions ont été utilisées durant cette thèse, correspondant à des solutions sans Ca^{2+} libre et contenant 2 mM en Ca^{2+} libres. Des études ont été réalisées sur la variation du Ca^{2+} cytosolique en fonction de la quantité de Ca^{2+} extracellulaire. De même, une solution avec 10 mM de Na^+ a été préparée de façon à étudier le fonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$. La composition de ces différentes solutions est reportée dans le tableau 18. Le N-méthyl-d-glucamine (*NMDG*) a été utilisé afin de remplacer le Na^+ sans modifier l'osmolarité de cette solution, cruciale pour l'intégrité des cellules et leurs viabilités.

Tableau 18 : Composition de différentes solutions extracellulaires utilisées lors des mesures de la concentration en Ca^{2+} cytosolique.

	PSS 2 mM Ca^{2+}	PSS 0 mM Ca^{2+}	PSS Na^+ 10 mM
Composés	concentration en mM		
NaCl	140	140	10
KCl	4	4	4
MgCl_2	-	2	1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4^-$	-	-	-
CaCl_2	2	-	2
HEPES	10	10	10
D-Glucose	11	11	11
EGTA	-	1	-
NMDG	-	-	130
pH	7,4 (NaOH)	7,4 (NaOH)	7,4 (NaOH)

9.2) Sonde Ca^{2+} ratiométrique : Le Fura-2-AM

Le Fura-2 AM est une sonde Ca^{2+} ratiométrique fluorescente. Cette sonde Ca^{2+} est dérivée d'un chélateur de Ca^{2+} , l'EGTA.

La quantité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de Ca^{2+} détectée par le Fura-2. La sonde Fura-2 AM émet une intensité de fluorescence à 515 nm, obtenue en réponse à une excitation aux longueurs d'ondes de 340 nm (F340) et de 380 nm (F380). Les analyses se font ensuite par la mesure du rapport de fluorescences obtenues à F340 et F380, qui nous permet d'estimer la concentration de Ca^{2+} cytosolique.

La calibration de la sonde Fura-2 AM a été réalisée avec l'aide d'un ionophore Ca^{2+} , la ionomycine (Sigma-Aldrich, France ; I3909). Deux solutions extracellulaires ont été réalisées,

avec la première à 0 mM de Ca^{2+} , 5 mM d'EGTA et 10 μM d'ionomycine. La deuxième solution est une solution avec 2 mM de Ca^{2+} et 10 μM d'ionomycine.

La solution sans Ca^{2+} est ajoutée aux cellules en premier et la deuxième solution avec 2 mM de Ca^{2+} est rajoutée permettant ainsi de calculer les rapports minimum (Rmin) et maximum (Rmax) à F340 et F380 de la sonde Ca^{2+} . La concentration de Ca^{2+} intracellulaire est par la suite calculée grâce à l'équation suivante :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd} \cdot \beta \cdot (\text{R} - \text{Rmin}) / (\text{Rmax} - \text{R})$$

Où $\beta = \text{F380} (2 \text{ Ca}^{2+}) / \text{F380} (0 \text{ Ca}^{2+})$ (D'après Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Le Kd est de $1,35 \text{ E-7}$

9.3) Imagerie Ca^{2+} sur cellules adhérentes

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri à fond en verre, la veille de l'expérience. Le lendemain, elles sont chargées avec 5 μM du Fura-2/AM pendant une durée de 45 minutes à 1 heure, à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS avec Ca^{2+} puis avec 2mL de PSS, dont la composition est présentée dans le tableau 18. Elles sont ensuite placées sur la platine d'un microscope inversé à fluorescence (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, France). La source d'excitation lumineuse provient d'une lampe Xénon 75-W et un monochromateur (Cairn Optoscan, UK) qui permet d'exciter alternativement la sonde aux deux longueurs d'ondes d'intérêt à 340 nm et à 380 nm. La sonde est excitée pendant 50 ms toutes les deux secondes. Le signal de fluorescence émis à 515 nm est récupéré et amplifié par un photomultiplicateur (PMT). Le signal est alors numérisé par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instrument, USA).

X). Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec les écart-types, « N » indique le nombre de fois que l'expérience a été réalisée et « n » désigne le nombre de répliques par condition N. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SigmaStat (version 3.0.1a, Systat Software, Inc). Sauf indication contraire, les données ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (n, nombre de cellules provenant d'expériences indépendantes). Pour une comparaison entre plus de deux groupes, il a été utilisé le test de Kruskal-Wallis suivie des tests de post-hoc de Dunn's, ou de Dunnett's le cas échéant. Les comparaisons entre deux groupes ont été faites en utilisant les tests de Mann-Whitney. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***.

Remarque : Les analyses de cytométrie et de spectrofluorimètre Ca^{2+} sur la Flexstation ont été réalisées par Romain Felix (UMR 1069, Tours). Les mesures de transcrits et de RT-qPCR ont été réalisées par Aurélie Chantôme (UMR 1069, Tours), je ne les ai pas détaillées dans ce « matériels et méthodes ». De la même façon, les analyses d'invasion sur cellules HCT-116 ont été réalisées par Maxime Guéguinou pendant sa thèse à l'UMR 1069, Tours.

Résultats

Objectifs du travail

La partie Résultats et Discussion qui suit présente les résultats que j'ai pu obtenir tout au long de mes trois années de thèse. Ces résultats se déclinent en deux parties, dont celle exposée, juste après, au travers d'un article scientifique. Les travaux de l'autre partie seront présentés et discutés à la suite.

Les objectifs de mes travaux de thèse ont été de :

- Caractériser le rôle de la protéine $\alpha 1D$ dans la migration cellulaire et dans la régulation du Ca^{2+} basal cytosolique des cellules cancéreuses coliques, HCT-116. Ces travaux ont conduit à l'écriture de l'article intitulé « **Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity** » Sci Rep. 2017 Oct 27;7(1):14199, publié dans le journal *Scientific Reports*. Dans ce manuscrit, nous avons montré que la protéine $\alpha 1D$ qui est surexprimée dans des biopsies de cancer du côlon favorise la migration cellulaire et régule la concentration cytosolique basale des HCT-116 en inhibant l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} et cela indépendamment de son activité canal.
- Identifier les résidus sérines du canal SK3 responsables de son inhibition par l'activation de la voie AMPc-PKA et de tester l'hypothèse selon laquelle l'Ohmlin favorise la phosphorylation du canal par la voie AMPc-PKA. En effet, nous savons que l'Ohmlin et l'activation de la voie AMPc-PKA inhibent l'activité du canal SK3 et dissocient le complexe SK3-Orai1 suggérant des mécanismes d'action communs. Nous avons identifié les sérines de la partie N-terminale de la protéine hSK3 par mutagenèse dirigée comme étant responsables de la sensibilité du canal à la PKA. Par contre, les mutations en N-terminale n'ont pas modifié la sensibilité du canal SK3 à l'Ohmlin.

Résultats partie I

Rôle de la protéine Ca^{2+} $\alpha 1\text{D}$ dans la migration cellulaire et dans la régulation du Ca^{2+} basal cytosolique des cellules cancéreuses coliques HCT-116

Résumé

Il est généralement admis que les canaux calciques voltage dépendant, CaV, régulent l'homéostasie Ca^{2+} des cellules excitables suite à une dépolarisation de la membrane plasmique. Cependant, peu d'études se sont intéressées au rôle des CaV dans les cellules dites non excitables et en particulier dans les cellules épithéliales cancéreuses. Des méta-analyses ont montré que l'expression des gènes codant pour des sous-unités constitutives des CaV est augmentée dans divers cancers. Le gène *CACNAID* codant pour la sous-unité $\alpha 1D$ du CaV1.3 est retrouvé surexprimé dans cette analyse et en particulier dans le cancer du côlon. Le but de notre étude a été d'étudier le rôle de la protéine $\alpha 1D$, protéine qui forme le pore du canal CaV1.3, dans la biologie des cellules épithéliales cancéreuses coliques non excitables, les HCT-116. Nos études montrent que la protéine $\alpha 1D$ est surexprimée dans les biopsies de cancer colorectal par rapport aux tissus normaux. Des ARN interférentiels, dirigés contre $\alpha 1D$, réduisent la migration et l'invasion des HCT-116. Ces siRNA réduisent la concentration basale de Ca^{2+} cytosolique et ont modifié la fréquence des oscillations du Ca^{2+} induite par l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ fonctionnant en mode reverse. Par ailleurs, l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ et plus précisément les NCX1 / 3 (tous les 2 exprimés dans les HCT-116) régulent le potentiel de membrane des cellules HCT-116 lorsque l'expression de la protéine $\alpha 1D$ est supprimée par siRNA. Ces résultats suggèrent que l'inactivation de la protéine $\alpha 1D$ favoriserait l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, ce qui va diminuer la concentration de Ca^{2+} basale cytosolique et réduire par conséquent la migration cellulaire des HCT-116. Cependant, la dépolarisation de la membrane plasmique n'induit pas d'augmentation du Ca^{2+} basal cytosolique. Les expériences de patch-clamp montrent clairement que le courant Ca^{2+} entrant est absent. Les études de cytométrie en flux et d'immunofluorescence ont montré que la protéine $\alpha 1D$ était localisée à la membrane plasmique, dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau. Ainsi, nous avons découvert une nouvelle voie de signalisation montrant que la protéine $\alpha 1D$ est impliquée dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} ainsi que dans la migration cellulaire par un mécanisme indépendant de sa fonction canonique à la membrane plasmique des cellules HCT-116. Cette régulation impliquerait l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique.

Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity

Yann Fourbon^{1,8*}, Maxime Guéguinou^{1,8*#}, Romain Felix^{1,8*}, Bruno Constantin^{2,8}, Arnaud Uguen^{3,4}, Gaëlle Fromont^{1,7,8}, Laurie Lajoie⁵, Christophe Magaud², Thierry Lecomte^{5,7,8}, Emmanuel Chamorey⁶, Aurélien Chatelier², Olivier Mignen^{3,8}, Marie Potier-Cartereau^{1,8}, Aurélie Chantôme^{1,8*}, Patrick Bois^{2*} and Christophe Vandier^{1,8*}

¹Inserm, UMR 1069, Université François Rabelais Tours, France.

²Equipe ERL 7368 CNRS, Université de Poitiers, France.

³Inserm UMR 1078 IFR148, Université de Bretagne Occidentale, France.

⁴CHRU Brest, France

⁵GICC– UMR 7292 Université de Tours, France.

⁶Unité d'Epidémiologie et Biostatistiques (UEB), Centre Antoine Lacassagne, France.

⁷CHRU Tours, France.

⁸From network “Ion channels and cancer-Canceropole Grand Ouest, (IC-CGO) France (www.ic-cgo.fr).

*These authors contributed equally to this work.

present address : Department of Cellular and Molecular Physiology, Penn State University School of Medicine, Hershey Medical Center, Hershey PA 17033, US.

Correspondence should be addressed to Christophe Vandier, Phone: +(33)247366024; Fax: +(33)247366226; E-mail: christophe.vandier@univ-tours.fr

Author Contribution

Aurelie C, PB and CV wrote the main manuscript text and jointly supervised the work, YF and MG made experiments of F.2 and supplemental Fig.1, YF, PB and Aurelien C made experiments of Fig.3AB, RF and MPC made experiments of Fig.4E, supplemental Fig.5, BC made experiments of Fig.3D, AG, GF, OM and EC made experiments of Fig.1 and Tables 1-3, LL and TL made experiments of Fig.3C supplemental Fig.4, CM made experiments of Fig.5A (Western Blot), AC made experiments of supplemental Fig.2/Fig.3A, YF made experiments of Fig.4A-D Fig.5 except western Blot, and supplemental Fig.3B. RF made experiments of supplemental Fig.3C. CV, PB, Aurelie C and YF prepared figures and all authors reviewed the manuscript.

Competing financial interests

There is no conflict of interest.

Abstract

It is generally accepted that voltage-gated Ca^{2+} channels, CaV, regulate Ca^{2+} homeostasis in excitable cells following plasma membrane depolarization. Here, we show that the Ca^{2+} protein $\alpha 1\text{D}$ of CaV1.3 channel is overexpressed in colorectal cancer biopsies compared to normal tissues. Gene silencing experiments targeting $\alpha 1\text{D}$ reduced the migration and the basal cytosolic Ca^{2+} concentration of HCT-116 colon cancer cell line and modified the cytosolic Ca^{2+} oscillations induced by the sodium/calcium exchanger NCX1/3 working in its reverse mode. Interestingly, NCX1/3 regulated membrane potential of HCT-116 cells only when $\alpha 1\text{D}$ was silenced, and blocking NCX1/3 increased cytosolic Ca^{2+} concentration and cell migration. However, membrane depolarization did not induce an increase in intracellular Ca^{2+} . Patch-clamp experiments clearly showed that the inward Ca^{2+} current was absent. Finally, flow cytometry and immunofluorescence studies showed that $\alpha 1\text{D}$ protein was localized at the plasma membrane, in cytosol and cell nuclei. Altogether, we uncover a novel signaling pathway showing that $\alpha 1\text{D}$ is involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis and cell migration by a mechanism independent of its plasma membrane canonical function but that involved plasma membrane $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger.

Keywords: *CACNA1D*, calcium entry, SOCE

Introduction

Voltage-gated Ca^{2+} channels (CaV) are activated by membrane depolarization and mediate Ca^{2+} influx in response to action potentials and subthreshold depolarizing signals. CaV are structurally made of five subunits ($\alpha 1, \alpha 2, \delta, \beta, \gamma$) with the $\alpha 1$ subunit forming the pore of the channel¹. The amino acid sequence is organized in four repeated domains each containing six transmembrane segments (S1–S6), and a membrane-associated loop between transmembrane segments S5 and S6¹. It is generally accepted that CaV control Ca^{2+} homeostasis of excitable cells (such as cardiomyocytes, neurons, smooth and skeletal muscular cells) whereas non voltage-gated Ca^{2+} channels regulate Ca^{2+} homeostasis of non-excitable cells. Among CaV, CaV1.3 was found to be required for hearing², for controlling excitability of chromaffin cells³ and for cardiac excitability by contributing either to diastolic depolarization of sino-atrial node pacemaker cells⁴ and atrial excitability⁵. In pathological conditions, CaV1.3 was found to contribute to the death of dopaminergic neurons in patients with Parkinson's disease⁶ and to primary aldosteronism leading to arterial hypertension⁷.

Recently, meta-analyses showed that expression of genes encoding CaV subunits are increased in various cancers⁸. This was the case of the *CACNA1D* gene coding for the $\alpha 1D$ subunit of CaV1.3 which is overexpressed in prostate, uterus and colon cancer⁸. In parallel, the $\alpha 1D$ subunit was found to control the migration and the proliferation of endometrial cancer cells *via* the regulation of its expression by estrogens⁹ and the expression of androgens receptor in the prostate cancer cells¹⁰. Nevertheless, the biological role of the $\alpha 1D$ subunit in colon cancer cells is not known, and it is important to recognize that its overexpression in colon cancer does not represent a causal link between high levels of the $\alpha 1D$ protein and colon cancer. Colorectal cancer (CRC) represents major problems of public health because of its incidence and its mortality^{11,12}. CRC is the third most common cancer in men (746,000 cases, 10.0% of the total) and the second in women (614,000 cases, 9.2% of the total)

worldwide ¹³. In France CRC is the second leading cause of cancer death and it accounts for nearly 12% of all cancer deaths, especially among those 65 years and older (<http://www.e-cancer.fr/>). In addition, CRC is characterized by metastasis development, which is the major cause of death of the patients developing a cancer. Although the mechanisms implied in the metastatic process are not yet completely elucidated, it is clear that the degradation of the extracellular matrix and the cellular migration, both regulated by Ca²⁺ channels ¹⁴, play a pivotal role in this process.

It has not been determined if the regulation of the biology of cancer cells by $\alpha 1D$ protein subunit depends on its plasma membrane canonical function. Indeed, $\alpha 1D$ protein of CaV1.3 also has non-canonical functions and is involved in transcriptional regulation of the expression of other proteins including potassium channels (for review ¹⁵). Indeed, $\alpha 1D$ protein does not only control the activity of the Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK2, of atrial cells but also its expression and its membrane localization. The C terminus of $\alpha 1D$ protein translocates to the nucleus where it functions as a transcriptional regulator to modulate the function of SK2 channel ¹⁰. In addition, the alternative splicing of C-terminus of $\alpha 1D$ protein, besides modifying the activity of CaV1.3, affects the pharmacological properties of CaV1.3 and its sensitivity to the DHP ¹⁶.

Here we investigated the role of the $\alpha 1D$ protein of CaV1.3 in the migration of the non-excitabile and epithelial cancer cells HCT-116, its contribution in intracellular Ca²⁺ regulation and we raised the question on its role as a channel in these cells. Our studies show that $\alpha 1D$ protein is overexpressed in CRC biopsies compared to normal tissues. Alpha 1D protein regulates the migration and invasion of HCT-116 colon cancer cells and its intracellular Ca²⁺ concentration by a mechanism that does not depend on its plasma membrane canonical function but that involves plasma membrane NCX1/3 exchanger and endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ release.

Results

Cav1.3 is overexpressed in colon tumor biopsies

We first explored the expression of $\alpha 1$ of CaV1 channels: $\alpha 1S$ (α subunit of CaV1.1), $\alpha 1C$ (α subunit of CaV1.2), $\alpha 1D$ (α subunit of CaV1.3) and $\alpha 1F$ (α subunit of CaV1.4) in CRC patients using the Human Protein Atlas (¹⁷; www.proteinatlas.org). Among all $\alpha 1$ proteins only $\alpha 1D$ was found overexpressed in CRC tissues compared to healthy tissues. Immunohistochemistry assays were performed on a series of 200 tissue-microarrays (TMA) included formalin-fixed and paraffin-embedded samples with paired tumor areas and healthy mucosa. $\alpha 1D$ staining was stronger in adenoma and adenocarcinoma tissues compared to normal tissues and in adenoma tissues compared to adenocarcinoma tissues (Figure 1AB). There was no difference in staining between moderately/poorly-differentiated (*i.e.* G2/G3) adenocarcinomas and well-differentiated (*i.e.* G1) ones (Figure 1C). We observed an influence of pT stages on $\alpha 1D$ staining suggesting a role of $\alpha 1D$ in the cell migration/invasion known to play a pivotal role in metastatic process (Figure 1C).

$\alpha 1D$ promotes migration of HCT-116 colon cancer cells.

After analysing the expression of $\alpha 1D$ in different tested CRC cell lines we investigated the role of $\alpha 1D$ of CaV1.3 channel in the migratory ability of CRC cells. The effect of three well-known CaV blockers from three different pharmacology families, verapamil, nifedipine and diltiazem were tested on CRC cells. Figure 2A showed that $\alpha 1D$ was found to be expressed in SW48, LoVo and HCT-116 cell lines with a higher expression in HCT-116 cell line.

Interestingly, HCT-116 originates from a cancer classified as Duke D with higher metastatic potential than Duke C tumors, from which SW48 and LoVo lines are derived ¹⁸. We therefore selected HCT-116 cell line for subsequent experiments. Verapamil treatment at 10 μ M (but not at 1 μ M) decreased the number of migrating cells (transwell assay) by 50% and the viability of HCT-116 cells by 25% (Fig. 2B, Supplemental Fig. 1AB). In contrast, nifedipine at 10 μ M (but not at 1 μ M or 5 μ M) increased the migration of HCT-116 cells while having

no effect on cell viability of HCT-116 (Fig. 2B, Supplemental Fig. 1AB). Finally, 10 μ M diltiazem (another CaV blocker) has no effect on HCT-116 cell migration (Supplemental Fig. 1B). To exclude that the decrease in cell migration by verapamil was caused by its effect on cell proliferation, cell migration was also assessed by a monolayer wound-healing assay. Cultures of confluent cells were scratched to create a denuded area, and then the cells at the wound edges were allowed to migrate into the denuded area over a 12 h period (during this time cells *did not proliferate*). After 12 h, the scraped areas were reduced and as observed using migration inserts nifedipine increased migration of HCT-116 cells while verapamil reduced it (Fig. 2C). Since verapamil is a well-known multidrug resistance blocker in cancer cells we tested the effect of two multidrug resistance blocker, NK571 and mitotane, on migration of HCT-116 cells. Figure 2C shows that these MDR blockers both reduced the migration of HCT-116 cells. To confirm the contribution of α 1D protein to HCT-116 cell migration/invasion, α 1D mRNA were silencing in HCT-116 cells with two different siRNA of α 1D (sia1D#1, sia1D#2), or with a scrambled-siRNA as a negative control (siCT). Figure 2D and supplemental figure 2 shows a marked suppression of α 1D expression in cells after transfection with siRNAs, when compared with cells transfected with scrambled-siRNA. The knockdown of α 1D markedly reduced the migration (Fig. 2DE) and the invasion (Supplemental Fig. 1CD) of HCT-116 without affecting cell viability (Supplemental Fig. 1D). These results suggest that α 1D protein promotes HCT-116 cell migration/invasion and that pharmacological blockers of CaV have a probable non selective effect.

HCT-116 colon cancer cell lack detectable voltage-gated inward Ca^{2+} currents.

The electrophysiological study was performed with the patch-clamp technique in whole cell configuration to test the canonical activity of α 1D protein as CaV channel on the plasma membrane. To maximize the inward current conductance Ba^{2+} was chosen instead of Ca^{2+} and the CaV opener (Bay k 8644) was added (see methods). Figure 3A-B show currents record

acquired in the range of -70 to 110 mV from holding potential of -100 mV. Surprisingly, no inward current was recorded in broken-patch configuration (Fig. 3A). Identically, no Ca^{2+} current was obtained in perforated-patch configuration, a configuration known to avoid rundown of the inward Ca^{2+} current (Fig. 3B1). This absence of inward Ca^{2+} current was obtained (in both experimental conditions) in 12 other cells. To test whether currents could be measured only in migrating cells, a cell monolayer in culture dishes was scratched, the migration of cells to the cleared area was inspected under a microscope 15 h after and cells were patched. Cell migration did not appear to affect the presence of Ca^{2+} current. Indeed, no inward Ca^{2+} current was recorded in migrating cells (Fig 3B2, n=5). The same results were obtained when cells were superfused with serum added during cell migration assays (Supplemental Fig. 1E). Previous studies have shown that cAMP/PKA pathway positively regulates $\text{CaV}1.3$ channels³. To study if the absence Ca^{2+} current is due to a lack of activation of basal cAMP/PKA pathway activation, 100 μM FSK (a well-known activator of adenylate cyclase) was applied to cells. In this condition no inward Ca^{2+} current was observed (Supplemental Fig. 1E). All together these experiments show that HCT-116 cells lack detectable plasma membrane inward CaV currents.

$\alpha 1\text{D}$ protein is localized at the plasma membrane, in cell nuclei and cytoplasm.

Having observed that $\alpha 1\text{D}$ protein was necessary for cancer cell migration/invasion without a plasma membrane canonical function we assessed its cellular localization. To determine the cellular distribution of $\alpha 1\text{D}$ protein, HCT-116 cells were permeabilized or not and analyzed by FACS using an antibody recognizing an extracellular epitope of $\alpha 1\text{D}$ protein when part of the CaV channel (Fig. 3C). The proportion of cells expressing $\alpha 1\text{D}$ at the plasma membrane surface was low: as measured by fluorescence analysis of intact or permeabilized cells with an $\alpha 1\text{D}$ protein antibody, $\approx 90\%$ of cells showed entirely intracellular localization of $\alpha 1\text{D}$ protein (Fig. 3C). To confirm these findings, immunofluorescence confocal microscopy studies were

performed on permeabilized HCT-116 cells. As suspected using the antibody that recognize the extracellular $\alpha 1D$ epitope, a major proportion of $\alpha 1D$ protein appeared to be localized in the cytoplasm and in the cell *nuclei* with a slight expression at the plasma membrane (*Fig 3D*). It was observed that the $\beta 3$ subunit of CaV favors Ca^{2+} channel plasma membrane expression by facilitating the intracellular trafficking of $\alpha 1D$ subunit toward the plasma membrane¹⁹. We observed a marked expression of the $\beta 3$ subunit in HCT-116 cells suggesting that its presence does not obligatory cause the plasma membrane localization of $\alpha 1D$ protein (Supplemental Fig. 3). Another protein, calreticulin a protein complexing Ca^{2+} normally found in ER was found to negatively regulate the surface expression of Cav1.3²⁰. Silencing of calreticulin did not result in increased this localization (Supplemental Fig. 4) demonstrating that this protein is not involved in intracellular retention of $\alpha 1D$ protein.

$\alpha 1D$ protein regulates basal cytosolic Ca^{2+} concentration of HCT-116 cells

Our findings revealed a novel signaling pathway in which the intracellular $\alpha 1D$ protein promoted cancer cell migration/invasion. Since cell migration/invasion has been found to be regulated by cytosolic Ca^{2+} concentration $[Ca^{2+}]_c$ ¹⁴, we tested the hypothesis that $\alpha 1D$ protein regulated $[Ca^{2+}]_c$ despite its lack of plasma membrane channel activity. Figure 4AB shows that silencing $\alpha 1D$ mRNA reduced the F340/F380 ratio of fura-2 fluorescence, and $[Ca^{2+}]_c$ of HCT-116 cells from approximately 130 nM to 70 nM. In contrast, acute applications of 10 μM verapamil or 10 μM nifedipine had no effect on F340/F380 of HCT-116 cells (Fig. 4A, Supplemental Fig. 3C). An increase in $[Ca^{2+}]_c$ is generally observed following depolarisation with high external K^+ concentration in excitable cells when $\alpha 1$ subunit forms a CaV channel in the plasma membrane. Depolarization of the plasma membrane by increasing external K^+ concentration up to 80 mM ($E_k = -15$ mV and activation threshold of CaV1.3 around -40 mV²¹) did not increase $[Ca^{2+}]_c$ (Fig. 4C). At -50 mV (the resting membrane potential of HCT-116 that is regulated by SK3 channel²²) a small steady-

state inactivation of CaV1.3 channel had been observed²¹. To assay whether the absence of effect of elevated K⁺ concentrations on [Ca²⁺]_c was due to the inactivation of α 1D protein we first hyperpolarized plasma membrane of HCT-116 using the SK3 channel activator, CyPPA²³, before increasing external K⁺ concentration. Figure 4C shows that despite of CyPPA pretreatment, an elevation of external potassium did not alter [Ca²⁺]_c. In addition, 10 μ M verapamil did not change [Ca²⁺]_c, as recorded in cells exposed to 40 mM of external K⁺ (Supplemental Fig. 3B). α 1D protein of CaV1.3 can regulate basal [Ca²⁺]_c either by activating a constitutive Ca²⁺ entry of Ca²⁺ from extracellular side or by promoting Ca²⁺ release from intracellular stores such as the ER. Figure 4D shows that the suppression of extracellular Ca²⁺ did not change basal [Ca²⁺]_c of HCT-116 cells that had been treated with α 1D siRNA. This suggests that α 1D protein does not regulate basal [Ca²⁺]_c through a constitutive Ca²⁺ entry from plasma membrane. In contrast, the suppression of α 1D protein reduced the thapsigargin (TG) Ca²⁺ responses of HCT-116 cells by decreasing the rising TG slope, TG area, TG peak Ca²⁺ responses and the relaxation TG slope (Fig. 4E). The effect on TG response (i.e. decrease in peak, area and rising slope) suggests that α 1D protein enhances Ca²⁺ ER release and/or [Ca²⁺]_{ER} loading, by a mechanism independent on Ca²⁺ current through α 1D. On the other hand, the effects of α 1D protein on basal [Ca²⁺]_c and/or TG response (decrease in area and in relaxation slope) could be explained by regulation of PMCA Ca²⁺ efflux, Na⁺ / Ca²⁺ exchanger (NCX) Ca²⁺ efflux or mitochondria Ca²⁺ uptake. Interestingly, silencing α 1D had no effect on store operated Ca²⁺ entry (SOCE) of HCT-116 cells (supplemental Fig. 5).

α 1D protein regulates cytosolic Ca²⁺ concentration by inhibiting NCX1/3 and promoting ER Ca²⁺ release

In order to maintain low [Ca²⁺]_c, NCX exchanges one Ca²⁺ ion for three Na⁺ ions. In its forward mode, inward (depolarizing) Na⁺ current drives Ca²⁺ extrusion from the cell while the reduction of Na⁺ current (by reducing external Na⁺ concentration) forces Ca²⁺ entry by NCX

thus working in its reverse mode. Figure 5A shows that KBR-7943 and SEA0400, two NCX blockers, both increased basal $[Ca^{2+}]_c$ demonstrating that NCX drives Ca^{2+} extrusion of HCT-116 cells. Western blot analysis of HCT116 extracts revealed a band of 110 kDa approximately, for NCX1 exchanger and bands of 110 to 140 kDa as expected for NCX3 exchanger (Fig. 5A). We did not detect NCX2 (data not shown). SEA0400 increased Ca^{2+} TG area and TG peak responses while having no effect on Ca^{2+} TG rising slope and increase the relaxation slope (Fig. 5B) suggesting that NCX1/3 regulates the decrease phase of $[Ca^{2+}]_c$ after TG- induced Ca^{2+} release. As expected, decreasing external Na^+ concentration increased $[Ca^{2+}]_c$ and induced Ca^{2+} oscillations (Fig. 5C). Silencing $\alpha 1D$ increased the amplitude of Ca^{2+} oscillations and reduced their frequency compared to siControl (Fig. 5D). As NCX1/3 are electrogenic it should regulate membrane potential of HCT-116 cells and $\alpha 1D$ should reduce its effect. We addressed this suggestion by applying current-clamp experiments to directly measure the effect of silencing $\alpha 1D$ upon the regulation of cell membrane potential by NCX1/3. Compared to control cells ($E_m = -57 \pm 5$ mV, $n=7$), silencing of $\alpha 1D$ reduced the negative membrane potential ($E_m = -38 \pm 6$ mV) ($p = 0.037$), suggesting that when NCX1/3 works in its forward mode (with a depolarizing Na^+ current) $\alpha 1D$ reduced its activity and hyperpolarized cells to -57 mV. We next examined the ability of decreasing external Na^+ concentration to hyperpolarize the cells. Figure 5E shows membrane potential records of control and si $\alpha 1D$ cells in solutions containing 140 mM (Na_{140}) and 10 mM Na^+ (Na_{10}) solutions with a significant higher hyperpolarization membrane potentials observed in cells with silenced $\alpha 1D$. Finally, SEA0400 markedly increased the migration of HCT-116 suggesting that $\alpha 1D$ protein promotes cell migration by inhibiting NCX1/3 (Figure 5F). In addition, same results were observed with LoVo cells (Supplemental Fig. 7).

Discussion

Our data have demonstrated that $\alpha 1D$ protein regulates migration/invasion of HCT-116 cells mainly through its non-canonical activity because: i) we did not detect any voltage-gated inward Ca^{2+} currents in these cells using patch clamp technique irrespective of the clamp configurations or the experimental conditions and ii) depolarization with high external K^+ solutions did not increase the $[Ca^{2+}]_c$ in contrast to what had been observed in excitable cells. $\alpha 1D$ protein of CaV channels has been found expressed in various cancer forms⁸ and has both canonical and non-canonical functions (for review see¹⁵). It was already observed that $\alpha 1D$ protein controls migration and proliferation of endometrial cancer cells⁹. In these cells $\alpha 1D$ protein expression was regulated by estrogen controlling Ca^{2+} influx⁹, and nifedipine was found to decrease cell migration, proliferation and autophagy²⁴. *CACNA1D* (gene encoding $\alpha 1D$) was found to be overexpressed in prostate cancer⁸ and nifedipine or verapamil reduced androgen-stimulated $[Ca^{2+}]_c$ increase^{10,25}. None of these reports have measured the Ca^{2+} channel activity of $\alpha 1D$ protein using patch-clamp, the *gold standard technique*. Demonstrating that nifedipine/verapamil or knocking down $\alpha 1D$ modified $[Ca^{2+}]_c$ and cell migration is not sufficient to conclude that $\alpha 1D$ protein works as a Ca^{2+} channel. While diltiazem has no effect on cell migration, we found that nifedipine increased the migration capacity of HCT-116 cells. Guo et al²⁶ reported that nifedipine stimulated the migration of cancer cells *via* the axis of miRNA-524-5p-BRI3–Erk pathway independently of its Ca^{2+} channel-blocking activity. Among non-selective effects of pharmacological inhibitors of CaV channels, nifedipine and verapamil were also found to inhibit potassium channels^{27,28} and we demonstrated that multidrug resistance blockers mimicked the effect of verapamil on cell migration.

All these data strongly suggest that the effects of verapamil and nifedipine on HCT-116 cell migration are not related to their Ca^{2+} channel-blocking activities. Moreover, CaV channels are activated on membrane depolarization and we found that increasing external potassium concentration up to 80 mM did not change $[\text{Ca}^{2+}]_c$. This was not due to an inactivated state of CaV1.3 since with CyPPA, a SK3 channel activator regulating membrane potential of HCT-116, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was not changed when increasing external potassium concentrations. All together, these data support a non-canonical function of $\alpha 1\text{D}$ protein in the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and calcium oscillations of HCT-116 cells.

$\alpha 1\text{D}$ protein was found to regulate NCX of HCT-116 cells. NCX genes comprise a family of three genes (NCX1, NCX2 and NCX3) thought to be involved in maintaining a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ²⁹, with NCX1 and NCX3 found expressed in HCT-116 colon cancer cells. At physiological extracellular concentration of Na^+ (140 mM) NCX allows the outward flow of Ca^{2+} ²⁹. This is what we observed in HCT-116 cells with NCX1/3 working in their forward mode. $\alpha 1\text{D}$ expression partly block NCX1/3, which can explain the relatively polarized values of membrane potential of these cells (NCX blockade by silencing $\alpha 1\text{D}$ depolarized cells by 20 mV). Using two blockers of NCX (KB-R7943 and SEA0400) we demonstrated that NCX1/3 regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ of HCT-116 by driving Ca^{2+} extrusion out of cell. Moreover, blocking of NCX with SEA0400 increased the migration of the HCT-116, probably by increasing $[\text{Ca}^{2+}]_c$. After switching to a low external Na^+ solution an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was observed with the generation of Ca^{2+} oscillations. This is explained by the exchanger working in its reverse mode allowing an inward flow of Ca^{2+} , which increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$. In this reverse mode NCX1/3 hyperpolarized HCT-116 cells. The suppression of $\alpha 1\text{D}$ protein of CaV1.3 was found to reduced $[\text{Ca}^{2+}]_c$, TG area, TG peak Ca^{2+} responses and increased hyperpolarization, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and oscillations amplitudes following reduction of extracellular Na^+ concentration. This suggests that $\alpha 1\text{D}$ protein negatively regulates NCX1/3 working in its forward (inhibits

outward flow of Ca^{2+}) and reverse mode (inward flow of Ca^{2+}). Intracellular Ca^{2+} oscillations has been observed in epithelial cancer colon cells³⁰ and were found to play important roles in carcinogenesis³¹ but to our knowledge this is the first report showing a regulation of intracellular Ca^{2+} oscillations by $\alpha 1\text{D}$ protein and NCX1/3. The molecular mechanisms regulated by NCX1/3 and CaV1.3 involved in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and Ca^{2+} oscillations remain to be elucidated but it seems unlikely that this is through the canonical function of plasma membrane CaV1.3. We postulate that $\alpha 1\text{D}$ protein interacts directly or indirectly not with NCX1/3 inducing the inhibition of NCX1/3. Such a direct interaction between NCX and transient receptor potential (TRP) was demonstrated by reciprocal co-immunoprecipitation and glutathione S-transferase (GST)-pull-down experiments in rat cardiac myocytes³². Moreover, interaction between $\alpha 1\text{D}$ protein and NCX1/3 should be favored by their localization in caveolae and probably by the presence of specific protein and/or lipids in these lipid rafts like caveolin and cholesterol. Another possibility is that a particular non pore $\alpha 1\text{D}$ protein, due to mutation or posttranslational modifications, may favor the interaction and the inhibition of NCX1/3. Moreover, $\alpha 1\text{D}$ protein both from plasma membrane and ER can modulate plasma membrane NCX1/3. Interestingly, even with low external Na^+ concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ was found to be lower after knocking down of $\alpha 1\text{D}$ compare to control cells. This can be explained by a control of ER Ca^{2+} release and/or PMCA Ca^{2+} efflux and/or mitochondria Ca^{2+} uptake by $\alpha 1\text{D}$. We can speculate that this depends on the localization of $\alpha 1\text{D}$ that was mainly found in intracellular compartments and probably ER. The cause of this particular localization remains to be elucidated.

In addition to regulate $[\text{Ca}^{2+}]_c$ through its non-canonical function $\alpha 1\text{D}$ protein was found to work as a transcription factor regulating the expression of proteins involved in the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and cell migration. Indeed, a fragment of the CaV1.3 C-terminus was reported to be translocate to the nucleus where it regulates the expression of the Ca^{2+} -activated K^+ channel,

SK2 channel, and protein regulating cell migration such as the myosin light chain³³. The C-terminus of CaV1.2 also acted as a transcription factor and its overexpression altered the expression of NCX1, the Ca²⁺ channel TRPV4 and Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK3 channel³⁴. In addition, the C-terminal end of CaV1.3 would play a significant role in the sensitivity to antagonists of CaV1.3 particularly those of the family of dihydropyridines (ex : nifedipine). Indeed, the alternate splicing of distal C-terminal end of CaV1.3, besides modifying the activity of CaV1.3, affects the pharmacological properties of CaV1.3 and the sensitivity to the DHP¹⁶. Since we detected α 1D protein in the nucleus further work needs to be done to confirm this data and elucidate the role of nuclear α 1D in HCT-116 cells.

In conclusion, our data have shown that α 1D protein regulates the migration and invasion of HCT-116 colon cancer cells and its intracellular Ca²⁺ concentration by a mechanism that did not depend on its plasma membrane canonical function but that involved plasma membrane NCX1/3 exchangers and ER Ca²⁺ release. In cancer, because of aberrant expression of Ca²⁺ channels, Ca²⁺ signaling becomes distorted and these alterations can cause a deregulation of Ca²⁺-dependent effectors that control signaling pathways determining cellular behavior and promoting pathophysiological cancer hallmarks in addition to decreasing chemotherapeutic efficacy. The discovery of new strategy aiming at decreasing one of these characteristics could have major repercussions in Public health. Consequently, the implication of α 1D protein of CaV1.3 in the Ca²⁺-dependent migration of cancer cells and its overexpression in colorectal cancer patients represents an opportunity to consider a new therapeutic concept.

Methods

Cell line culture

Colons cancer cell lines HCT-116, Lovo and SW48 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Opti-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), without antibiotics at 37°C in 95% (v/v) air /5% (v/v) CO₂. Ahmed et al., described disease stage, type, epigenetic and genetic features of these cancer cell lines that are derived from patients having colon cancer are ¹⁸.

Immunohistochemistry

Tissue microarray (TMA) blocks were built on the basis of 200 formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal samples (166 adenocarcinomas and 34 adenomas). The characteristics of patients and tissues are summarized in Table 1. Written informed consent was obtained from all patients and all samples were included in the registered tumor tissue collection n° DC-2008-214. Immunohistochemistry was performed on tissue section from the TMA blocks using CaV1.3 (HPA020215, Sigma Aldrich, Red revelation). Staining intensity was assigned with a semi-quantitative scale as follows: 0, no stained cells; 1, faint or weak staining; 2, moderate staining; or 3, strong staining intensity.

Electrophysiological recordings

Currents were recorded using two whole-cell configurations; “broken patch” and “perforated patch”. The measurements were carried out at room temperature (22°C). Fire-polished, patch electrodes (2 MΩ) were pulled from borosilicate glass capillaries using a vertical micropipette puller (Narishige, Tokyo, Japan). Voltage clamp experiments were performed using an Axopatch 200A amplifier with a CV 203BU headstage (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Series resistance compensation was performed to values >80% to minimize voltage errors. Voltage command pulses were generated by a personal computer equipped with an analog-digital converter (Digidata 1200, Molecular Devices) using pCLAMP software v8.0

(Molecular Devices). To obtain the perforated patch configuration³⁵ amphotericin B was added in the pipette solution (without EGTA). Amphotericin B was dissolved in dimethylsulfoxide (50 mg/ml) and diluted to a final concentration of 0.15 mg/ml in electrode solution. A gigaohm seal was established on the cell surface and capacitance transients were monitored. After the gigaseal between the pipette and the cell was achieved, the electrical access to the cytoplasm was monitored by applying 10 mV pulses for 10 ms from a holding potential of -70 mV and monitoring the capacitive transient.

The patch pipettes were filled with (mM): TEACl 120, MgCl₂ 3.5, HEPES/NaOH 10, pH = 7.2. EGTA at 10 mM was added in normal whole-cell patch configuration. The bath solution contained (mM): CsCl 100, KCl 2.5, BaCl₂ 20, and HEPES 10. The pH was adjusted to 7.4 using NaOH.

The use of Ba²⁺ as the charge carrier instead of Ca²⁺ has a number of advantages: (1) conductance for Ba²⁺ ions *versus* Ca²⁺ ions through Ca²⁺ channels is larger³⁶, thereby increasing the signal-to-noise ratio; (2) in the presence of Ba²⁺ ions, the inactivation of L-type Ca²⁺ channel is slowed while the inactivation of the T-type is unaffected, which helps for their identification³⁷; (3) it reinforces blocks to many K⁺ currents; and (4) Ba²⁺ was chosen instead of Ca²⁺ to suppress residual outward currents due to Ca²⁺ mediated permeability.

In voltage clamp mode IV protocol was performed with a succession of depolarizing pulses from -70 to 50 mV with 20 mV steps and 600 msec duration from a holding potential at -100mV. The current was filtered at 5 kHz and sampled at 50 kHz.

Current-clamp ($I = 0$) experiments were performed using the “broken patch” whole-cell recording configuration of the patch clamp technique. Pipette solutions contained (in mM): K-glutamate 125, KCl 20, MgCl₂ 1, Mg-ATP 1, HEPES 10, and pH was adjusted to 7.2 with KOH and various concentrations of CaCl₂ and EGTA were added to obtained calculated pCa= 6 (0.87 mM CaCl₂ and 1 mM EGTA) or pCa=7 (0.37 mM CaCl₂ and 1 mM EGTA).

Intracellular Ca²⁺ measurement

Intracellular Ca²⁺ concentrations were estimated using the ratiometric fluorescent dye Fura-2. Cells were plated on cover slips (Fluorodish FD35-100, WPI, UK) in culture medium. Cells were incubated in OptiMEM containing Fura-2 AM (5 µM) (Molecular Probes, F1201 – 1mg), the membrane-permeant acetoxymethyl ester form of Fura-2, diluted in DMSO, during 45-60 min at 37°C. Cells were then washed with OptiMEM and left for 2 additional minutes before recording. For SOCE measurement, free-Ca²⁺ PSS (1 ml) was added and cells were treated by Thapsigargin (5 µM), after a stabilizing time (around 150 s). After total ER-depletion, PSS, with 2 mM CaCl₂, was added.

Samples were analyzed using either a microscope or a FlexStation. The excitation light source was a 75-W Xenon arc lamp. Excitation light at the two-excitation wavelengths maxima of Fura-2 (340/380 nm) was chopped by a monochromator (Cairn Optoscan, UK). The excitation protocol was a 50 ms excitation at each wavelength every 4 s. Excitation light was directed through a 20× objective with a numerical aperture of 1.4 (Nikon Plan Apo, France). Fluorescence emissions at 510 ± 20 nm were detected by a filter (PMT) placed in the microscope body. Cells were then added in 96-well clear-bottom plates (Corning, USA), at a density of 20,000 cells/well. For the Flexstation, cells were incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 h. Ca²⁺ flux was measured with the Fura-2 dye at 5 µM. Cell medium was removed, 200 µl of the dye was added, and then the mixture was incubated for 45 min to 1 h at 37 °C. Prior to the experiment, 100µl/well of FlexStation buffer for SOCE, free-Ca²⁺ solution) was added. The excitation wavelengths were set at 340 and 380 nm, and the emission was set at 510 nm (auto cutoff: 495 nm). The injection volume was 20µl / well. Measurements were performed every 4s. [Ca²⁺]_c was calculated as described previously using in situ calibration³⁸. A K_d of 135 nM was used for these calculations, according to the supplier information on this batch of Fura-2 (Molecular Probes, USA). The physiological

saline solution (PSS) or 2Ca solution had the following composition (in mM): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 4, CaCl₂ 2, D-glucose 11.1 and HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The Ca²⁺ free solution or 0Ca is a PSS solution without CaCl₂ and with 1 mM EGTA. The ionomycin was used at 5 μM. High external potassium solutions were prepared by adding 56 mM KCl (K60) or 76 mM KCl (K80) and high external solutions by adding 56 mM NaCl (Na196) or 76 mM NaCl (Na216).

The peak amplitude of the Ca²⁺ TG responses was measured by calculating the difference between the basal and the maximal Ca²⁺ ratio after TG application, in Ca²⁺-free solution. The rising slope of the Ca²⁺ TG responses was determined by linear regression curve fitting 20 sec after TG application and was an estimation of the speed of the Ca²⁺ release by ER. The area of the Ca²⁺ TG responses was determined by integral calculation of the area under the curve, after TG application. The relaxation of the Ca²⁺ TG responses was determined by the half-return time: it is the subtraction of time at the peak minus the time the return at the half of peak value. Peaks and area TG Ca²⁺ responses represented both Ca²⁺ ER release and/or [Ca²⁺]_c decrease (through PMCA Ca²⁺ efflux, Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) Ca²⁺ efflux or mitochondria Ca²⁺ uptake but not SERCA Ca²⁺ efflux since TG is present).

Trans-well migration and invasion assays and Wound healing migration assay

Trans-well migration assays were performed as described previously ²². Trans-well invasion were assessed as trans-well migration assays but membrane was covered with a Matrigel® matrix ³⁹. Briefly, after 24 h, stationary cells were removed from the top side of the membrane, whereas migrated cells in the bottom side of the inserts were fixed, stained, and counted in five different fields (magnification, x200). At least three independent experiments were each performed in triplicate. Wound healing migration assays were performed from cell monolayer on 6-well culture plate where wounds were made with a sterile 2mm-wide tip. After wash, cells were treated or not with different drugs. Phase-contrast images of the wound

were obtained at the time of scratching and after 12 h. Automatic acquisitions were performed on a Nikon microscope (eclipse ti), coupled to a Nikon camera (DS Qi2). The system includes a cage incubator (Okolab, USA) controlling temperature, levels of CO₂ and O₂. Analyses were performed using NIS Element AR software. Briefly, the analyzes were processed by measuring the area of the injured area to 0 h and 12 h after injury with and without treatment. The injury area before and after the test was measured and compared to the control. The values were plotted as the percentage of the wound closure, with the initial width set to the normalized control.

Flow cytometry analysis

Cells were incubated at 4°C with saturating concentrations of CaV1.3 antibody (1:200 Alomone ACC-311) in the dark for 45 min, washed twice with PBS, supplemented with 0.1% Azide-PBS-4% FBS. The same antibody directed against an extracellular epitope of Ca_v1.3 channel, anti-Ca_v1.3 (extracellular) antibody (ACC-311 antibody, Alomone) was used for intracellular and extracellular staining. For Intracellular staining, cells were washed with cold PBS then incubated for 20 min with 100 µL of Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences). After, cells were incubated with a rabbit anti-CaV1.3 antibody for 45 min at 4°C. Then, cells were washed and incubated with an anti-rabbit coupled to an Alexa Fluor 488 for 45 min at 4°C. All flow cytometry (FCM) analyses were performed with a minimum of 10000 events using a Gallios flow Cytometer and Kaluza version 1.2 (Beckman Coulter).

Immunofluorescence microscopy

HCT-116 cell line were plated overnight on glasses and subsequently fixed (PBS 1X PFA 4%), permeabilized (Triton X100 0.1%), blocked (BSA 5%) and incubated with primary rabbit anti-CaV1.3 (extracellular) antibody (ACC-311, Alomone, 1/200) for 1h at 4°C. Glasses are washed (3x) and incubated with a secondary AlexaFluor 488-conjugated anti-

rabbit (green color, Invitrogen, Carlsbad, NM, USA, dilution 1/400). Control experiments were performed using only secondary AlexaFluor 488-conjugated anti-rabbit. Acquisitions were performed with a JAI camera (model CV-M4+CL), with the use of an automated filter wheel coupled to a Leica DMRB fluorescence microscope (Leica Microsystems). Analyses were performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MA, USA).

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

This work was funded by the ARC fund of “University of Tours and University of Poitiers”, “INSERM”, the “Région Centre” of France (LIPIDS project of ARD2020 Biomédicaments), the “Ligue Nationale Contre le Cancer” (committees of Charente, Indre et Loire, Mayenne and Morbihan), the Association “CANCEN” and Tours’ Hospital oncology association ACORT." Yann Fourbon and Maxime Guéguinou held fellowship from the “Région Centre”. We thank the « Local tumor tissue biobank BB-0033-00037 (“CRB Santé/Tumorotheque de Brest”) » and the UTTIL platform of Tours (Unité Technologique Transversale Innovante des Laboratoires). We also thank Pr Gunther Weber for its helpful comments on the manuscript, Aurore Douaud-Lecaille, Morgan Aubry and Isabelle Domingo for technical assistance and Catherine Leroy for secretarial support.

References

1. Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol***3**, a003947 (2011).
2. Brandt, A., Striessnig, J. & Moser, T. CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci***23**, 10832-10840 (2003).
3. Vandael, D. H., Mahapatra, S., Calorio, C., Marcantoni, A. & Carbone, E. Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochim Biophys Acta***1828**, 1608-1618 (2013).
4. Mangoni, M. E. *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A***100**, 5543-5548 (2003).
5. Zhang, Z. *et al.* Functional roles of Cav1.3(alpha1D) calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice. *Circulation***112**, 1936-1944 (2005).
6. Chan, C. S. *et al.* 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature***447**, 1081-1086 (2007).
7. Scholl, U. I. *et al.* Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet***45**, 1050-1054 (2013).
8. Wang, C. Y., Lai, M. D., Phan, N. N., Sun, Z. & Lin, Y. C. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS One***10**, e0125766 (2015).

9. Hao, J. *et al.* Ca²⁺ channel subunit alpha 1D promotes proliferation and migration of endometrial cancer cells mediated by 17beta-estradiol via the G protein-coupled estrogen receptor. *Faseb J***29**, 2883-2893 (2015).
10. Chen, R. *et al.* Cav1.3 channel alpha1D protein is overexpressed and modulates androgen receptor transactivation in prostate cancers. *Urol Oncol***32**, 524-536 (2014).
11. Hagggar, F. A. & Boushey, R. P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg***22**, 191-197 (2009).
12. Siegel, R., Desantis, C. & Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin***64**, 104-117 (2014).
13. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer***136**, E359-386 (2015).
14. Deliot, N. & Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta***1848**, 2512-2522 (2015).
15. Buchanan, P. J. & McCloskey, K. D. CaV channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics. *Eur Biophys J* (2016).
16. Huang, H., Yu, D. & Soong, T. W. C-terminal alternative splicing of CaV1.3 channels distinctively modulates their dihydropyridine sensitivity. *Mol Pharmacol***84**, 643-653 (2013).
17. Uhlen, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science***347**, 1260419 (2015).
18. Ahmed, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis***2**, e71 (2013).

19. Bichet, D. *et al.* The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron***25**, 177-190 (2000).
20. Karnabi, E., Qu, Y., Yue, Y. & Boutjdir, M. Calreticulin negatively regulates the surface expression of Cav1.3 L-type calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun***437**, 497-501 (2013).
21. Bell, D. C. *et al.* Biophysical properties, pharmacology, and modulation of human, neuronal L-type (alpha(1D), Ca(V)1.3) voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol***85**, 816-827 (2001).
22. Gueguinou, M. *et al.* SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget* (2016).
23. Hougaard, C. *et al.* Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Br J Pharmacol***151**, 655-665 (2007).
24. Bao, X. X. *et al.* Nifedipine induced autophagy through Beclin1 and mTOR pathway in endometrial carcinoma cells. *Chin Med J (Engl)***125**, 3120-3126 (2012).
25. Sun, Y. H., Gao, X., Tang, Y. J., Xu, C. L. & Wang, L. H. Androgens induce increases in intracellular calcium via a G protein-coupled receptor in LNCaP prostate cancer cells. *J Androl***27**, 671-678 (2006).
26. Guo, D. Q., Zhang, H., Tan, S. J. & Gu, Y. C. Nifedipine promotes the proliferation and migration of breast cancer cells. *PLoS One***9**, e113649 (2014).
27. Catacuzzeno, L., Trequattrini, C., Petris, A. & Franciolini, F. Mechanism of verapamil block of a neuronal delayed rectifier K channel: active form of the blocker and location of its binding domain. *Br J Pharmacol***126**, 1699-1706 (1999).

28. Li, X. T., Li, X. Q., Hu, X. M. & Qiu, X. Y. The Inhibitory Effects of Ca²⁺ Channel Blocker Nifedipine on Rat Kv2.1 Potassium Channels. *PLoS One***10**, e0124602 (2015).
29. Blaustein, M. P. & Lederer, W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev***79**, 763-854 (1999).
30. Rey, O., Young, S. H., Jacamo, R., Moyer, M. P. & Rozengurt, E. Extracellular calcium sensing receptor stimulation in human colonic epithelial cells induces intracellular calcium oscillations and proliferation inhibition. *J Cell Physiol***225**, 73-83 (2010).
31. Parkash, J. & Asotra, K. Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci***87**, 587-595 (2010).
32. Eder, P. *et al.* Phospholipase C-dependent control of cardiac calcium homeostasis involves a TRPC3-NCX1 signaling complex. *Cardiovasc Res***73**, 111-119 (2007).
33. Lu, L. *et al.* Regulation of gene transcription by voltage-gated L-type calcium channel, Cav1.3. *J Biol Chem***290**, 4663-4676 (2015).
34. Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. & Dolmetsch, R. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell***127**, 591-606 (2006).
35. Horn, R. & Marty, A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol***92**, 145-159 (1988).
36. Hess, P., Lansman, J. B. & Tsien, R. W. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol***88**, 293-319 (1986).
37. Bean, B. P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol***86**, 1-30 (1985).

38. Gannier, F., White, E., Lacampagne, A., Garnier, D. & Le Guennec, J. Y. Streptomycin reverses a large stretch induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res***28**, 1193-1198 (1994).
39. Chantome, A. *et al.* KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res***315**, 3620-3630 (2009).

Figure Legends

Figure 1. Immunohistochemical analysis of $\alpha 1D$ protein expression in colon tissues microarrays. A, Proportion of samples showing no (white), low (light gray), medium (black grey) or strong (black) $\alpha 1D$ staining in normal mucosa, compared with adenoma and adenocarcinoma samples. The number of samples per condition is indicated in brackets. $\alpha 1D$ staining was stronger in adenoma (χ^2 , $p < 0.04$) and adenocarcinoma tissues (χ^2 , $p < 0.001$) compared to normal tissues and in adenoma tissues compare to adenocarcinoma tissues (χ^2 , $p < 0.03$). B, $\alpha 1D$ protein of CaV1.3 expression in normal mucosa (left), adenoma (center) and adenocarcinoma (right) from a same sample (1:100 dilution, Red revelation, Hematoxylin counter-coloration). Magnification, x100 (top), x300 (bottom). C, Proportion of samples showing no (white), low (light gray), medium (black grey) or strong (black) $\alpha 1D$ staining according to the state of differentiation (right) or stage (left) of adenocarcinoma samples. No difference was observed according the state of differentiation of adenocarcinoma samples (Kruskall Wallis test, $p = 0.5$). An influence of pT stages was observed on $\alpha 1D$ staining (Kruskall Wallis test, $p = 0.008$).

Figure 2. $\alpha 1D$ protein regulates HTC116 cancer cell migration. A, Representative cropped western blot of $\alpha 1D$ protein expression in colon cancer cell lines (N = 3). Full-length western blots are included in the Supplementary Fig 2A. Lower panel, levels of $\alpha 1D$ proteins in colon cancer lines were determined by densitometry scanning to generate the values shown in the

bar graph. Results are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, (N = 3, Holm-Sidak test). B, Histograms showing the effect of 10 μ M verapamil and 10 μ M nifedipine on HCT-116 cell migration using inserts cell migration assays. The normalized cell number corresponds to the ratio of total number of cells in presence of drugs / total number of migrating cells in control experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.01$, N = 3, n = 3, Mann Whitney test). C, Histograms showing the effect of 10 μ M verapamil (left), 10 μ M nifedipine (middle) and 25 μ M NK571 or 5 μ M Mitotane (MDR blockers) (right) on HCT-116 cell migration ability using a monolayer wound-healing assay. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control (nifedipine: $p = 0.001$, N = 3, n = 9, verapamil : $p = 0.005$, N = 4, n = 12, NK571 : $p = 0.028$, N = 3, n = 9 and Mitotane : $p = 0.098$, N = 3, n = 9, Mann Whitney tests). The normalized cell number corresponds to the ratio of capacity to repair the damaged area in presence of drugs / total capacity to repair in control. Effect of silencing $\alpha 1D$ on migration of HCT-116 using inserts (D) and wound-healing (E) cell migration assays. The inset shows the validation of $\alpha 1D$ protein extinction by cropped immunoblots 48 h after transfection. Full-length Western blots are included in the Supplementary Fig 2B. Results are normalized to si control condition and expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control (inserts assays, $p = 0.001$, N = 3, n = 9, wound healing, $p = 0.001$, N = 4, n = 12, Mann Whitney tests). The image in E represent denuded areas at 0 and 12 h for cells silenced or not for $\alpha 1D\#1$.

Figure 3. Lack of detectable voltage-dependent Ca^{2+} currents and cellular localization of $\alpha 1D$ protein. A-B, Current records during 600 ms pulses in the range of -70 to 110 mV from holding potential of -100 mV. Representative examples of current recording in presence of barium (20 mM) and Bayk 8644 (50 μ M) in broken (A) and perforated (B) patch configurations. Whole cell currents are obtained in normal condition (B.1) and during the

migration process (B.2). Arrows indicates zero current. C, Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of $\alpha 1D$ protein in HCT-116 cell line permeabilized or not. Control staining is shown in light grey, and dark grey represent staining with anti-CaV1.3. Graph represents the percentage of cells (N = 6) expressing $\alpha 1D$ protein in permeabilized (Total) and not permeabilized cells (Plasma membrane cell surface).D, Subcellular distribution of $\alpha 1D$ protein in HCT-116 cell line. A primary anti-CaV1.3 antibody was used with a secondary AlexaFluor 488-conjugated anti-rabbit (green color).The short arrows indicate the location $\alpha 1D$ protein in the edges membranes, and the long arrows show the presence of $\alpha 1D$ protein in the cytosol.

Figure 4. $\alpha 1D$ protein regulated basal cytosolic Ca^{2+} concentration of HCT-116 cells

A, left, example of measurement of F340/F380 recorded in control condition and in cell in which $\alpha 1D$ was silenced. Middle, histograms showing mean \pm S.E.M of F340/F380 with a significant differences between control and $si\alpha 1D\#1$ conditions (F340/F380 : $p= 0.001$, N = 5, n = 89 si-control ; N = 6, n = 97 $si\alpha 1D$, Mann Whitney tests). Right, representative traces recorded in the presence or not of verapamil in control condition and in cell in which $\alpha 1D$ was silenced (N=3, n=6). B, Histograms showing mean \pm S.E.M of $[Ca^{2+}]_c$ with a significant differences between control and $si\alpha 1D\#1$ conditions ($p = 0.001$, N = 3, n = 47 si-control ; N = 3, n = 58 $si\alpha 1D\#1$, Mann Whitney tests). C, left, effect of high external concentrations of K^+ (4 + 56 mM: K60 and 4 + 76 mM: K80) with or without 20 μ M CyPPA on $[Ca^{2+}]_c$ (N = 3, n = 17) and of high external concentrations of Na^+ as osmotic control solutions (140 + 56: Na196 and 140 + 76: Na216). None of the changes induced a significant effect (N = 3, n = 10). D, Time dependent measurements of $[Ca^{2+}]_c$ with (2 Ca) or without (0 Ca) external Ca^{2+} solutions. E, left, time dependent measurements of $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of TG (5 μ M) in control cells and cells that have been silenced for $\alpha 1D$ ($si\alpha 1D\#1$). Histograms showing the effect of silencing $\alpha 1D$ on TG rising slope, the TG area, the TG peak Ca^{2+} responses and the

TG relaxation slope. Results are normalized to siCT and are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.001$, $N = 4$, $n = 32$, Mann Whitney test).

Figure 5. $\alpha 1D$ protein regulated cytosolic Ca^{2+} concentration by inhibiting NCX. A, left, the schema represents NCX working in its forward mode driving Na^+ entry and Ca^{2+} efflux. Middle, Histograms showing the effect of 10 μM SEA0400 or 30 μM KBR7943 on F340/F380 ratios. Results are normalized to CT conditions and are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.05$, $N = 3$, $n = 2$, Kruskal-Wallis one way analysis of variance. Right, Representative cropped Western blot of NCX1 and NCX3 in HCT-116 colon cancer cells ($N = 3$). Full-length Western blots are included in the Supplementary Fig. 6. B, Histograms showing the effect of 10 μM SEA0400 on TG slope, the TG area, the TG peak Ca^{2+} responses and the TG relaxation slope. Results are normalized to CT conditions and are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.001$, $N = 3$, $n = 12$, Mann Whitney test). C, time dependent measurements of $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of 140 mM (Na140) or 10 mM (Na10) of external Na^+ concentration. The schema represents NCX working in its reverse mode driving Na^+ efflux and Ca^{2+} entry. Histograms showing the effect of reducing external Na^+ concentration to 10 mM on the amplitude and on the frequency of Ca^{2+} responses. Results are expressed as mean \pm S.E.M. D, time dependent measurements of $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of 140 mM or 10 mM of external Na^+ concentration in control cells or in cells that have been silenced for $\alpha 1D$. Histograms showing the effect of silencing $\alpha 1D$ (si $\alpha 1D\#1$) on the amplitude and on the frequency of Ca^{2+} responses. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control (amplitude: $p = 0.001$, $N = 5$, $n = 77$; $N = 6$, $n = 94$, Mann Whitney test and for frequency : $p = 0.001$, $N = 5$, $n = 53$; $N = 6$, $n = 81$, Mann Whitney test). E, examples of membrane potentials recorded in one control HCT-116 cell and in one HCT-116 cell that have been silenced for $\alpha 1D$ using the patch clamp technique in current clamp mode. Membrane potentials were recorded in Na140 or Na10

solutions. Histogram showing membrane potential variations between Na140 and Na10 conditions in control and α 1D cells. Results are expressed as mean, bars, SEM. * Significantly different from control ($p = 0.005$, $N = 3$, $n = 7$ si-control ; $N = 3$, $n = 6$ si α 1D#1, Mann Whitney test). ND: not determined. F. Effect of silencing α 1D in presence or not of 1 μ M SEA0400 on migration of HCT-116 cells (wound-healing cell migration assays). Results are normalized to si control conditions and results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control (Si-Control with SEA0400; si α 1D; si α 1D with SEA0400, $N=4$, $n=14$).

Tables

Table 1 : Patients and tissues characteristics.

Groups	ADE (n=34)	ADK (n=165)
Age y, median (range)	62 (39-87)	69 (28-89)
Male/Female	24/10	107/58
Localization		
Rectum	n=3	n=44
Left colon	n=22	n=56
Transverse colon	n=1	n=8
Right colon	n=6	n=55
Differentiation		
G1	NA	n=91
G2		n=48
G3		n=14
Pathological stage		
pTis	NA	n=20
pT1		n=7
pT2		n=20
pT3		n=96
pT4		n=22

NT: normal colorectal tissue; ADE: adenoma; ADK: adenocarcinoma. y: years; NA, not applicable.

Table 2 : α 1D expression in colorectal tissues. Statistics were performed using was performed using the χ^2 test.

α 1D	NT	ADE	ADK	Differences	
-	n= 26	n= 0	n=1		
+	n= 67	n=12	n=37	NT vs	↑ p = 0,04
++	n= 23	n=7	n=64	ADE	↑ p <0,0001
+++	n=0	n=0	n=19	NT vs	↑ p = 0,03
				ADK	
				ADE vs	
				ADK	

NT: normal colorectal tissue; ADE: adenoma; ADK: adenocarcinoma.

Table 3 : Association with differentiation and stage. Statistics were performed using Kruskal wallis ordinal test.

α 1D expression		-	+	++	+++	p
Differentiation	G1	n=1	n=24	n=36	n=10	
	G2	n=0	n=7	n=19	n=8	0,5
	G3	n=0	n=2	n=5	n=0	
Stage	pT1	n=0	n=5	n=1	n=0	
	pT2	n=0	n=4	n=8	n=5	0,008
	pT3	n=0	n=17	n=40	n=9	
	pT4	n=0	n=8	n=6	n=3	

Figure 1

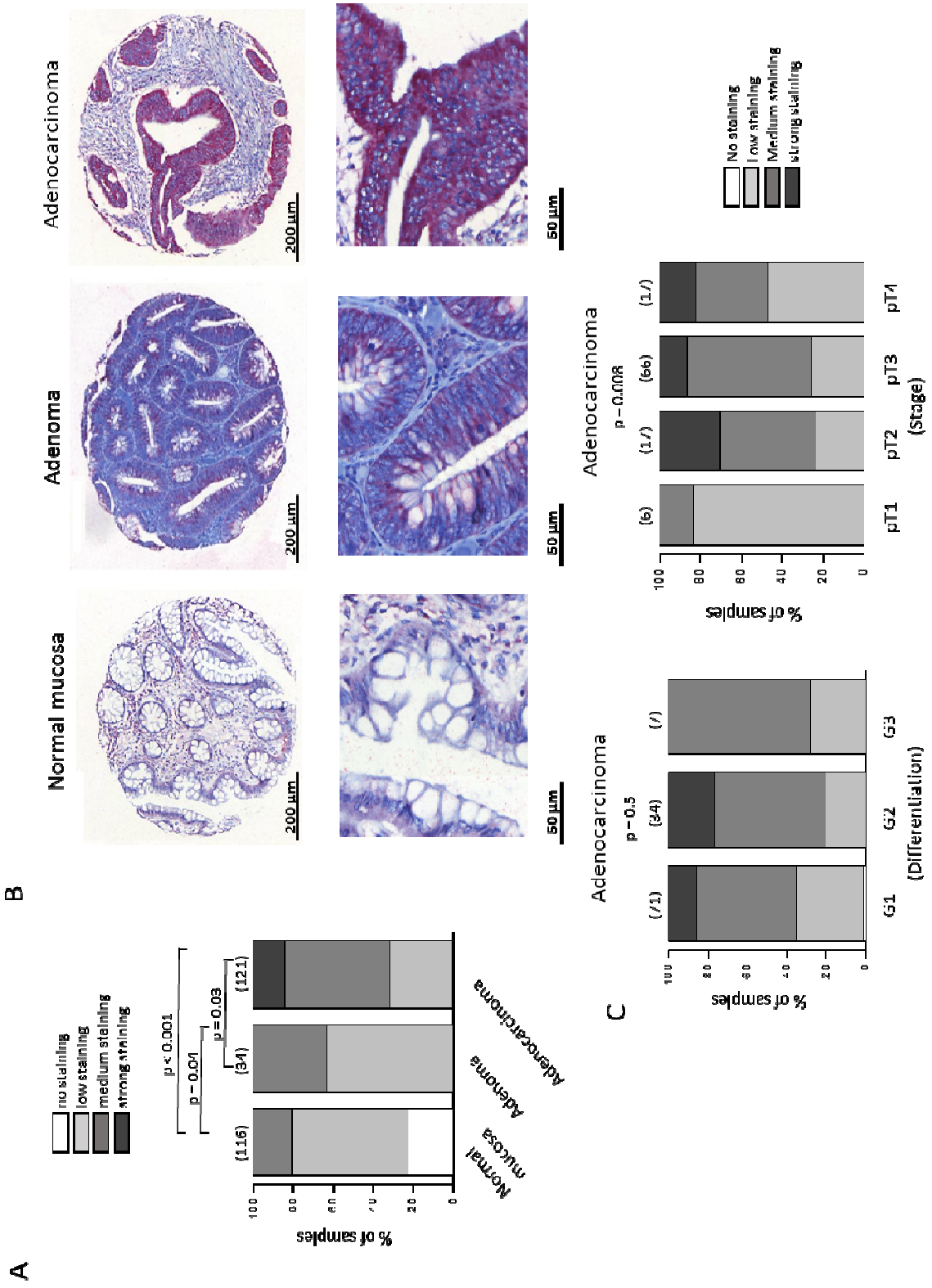
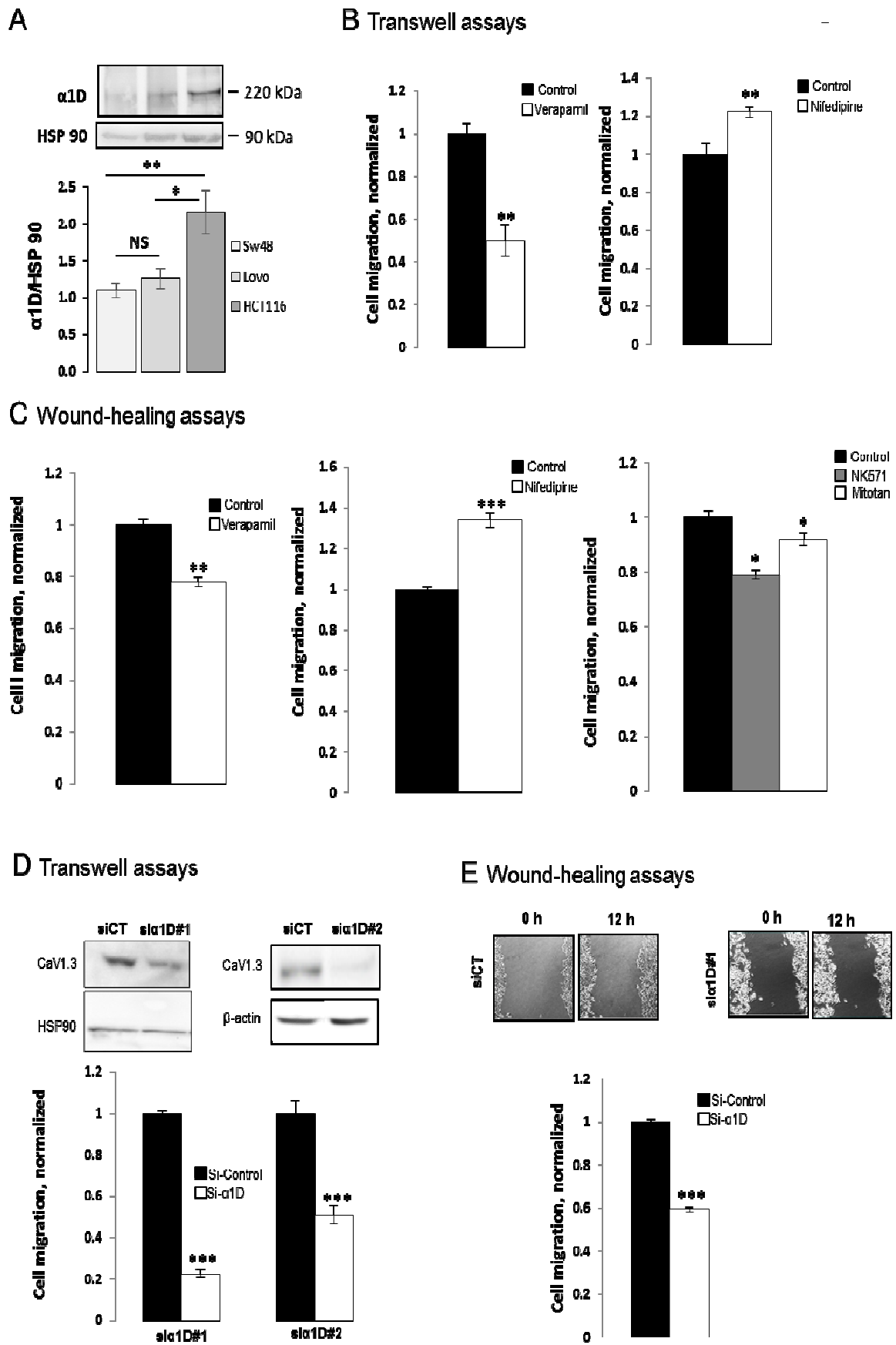


Figure 2



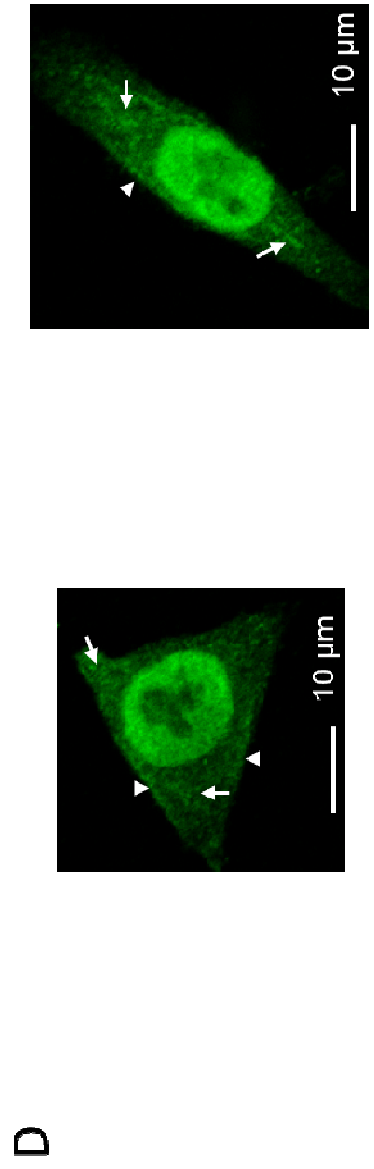
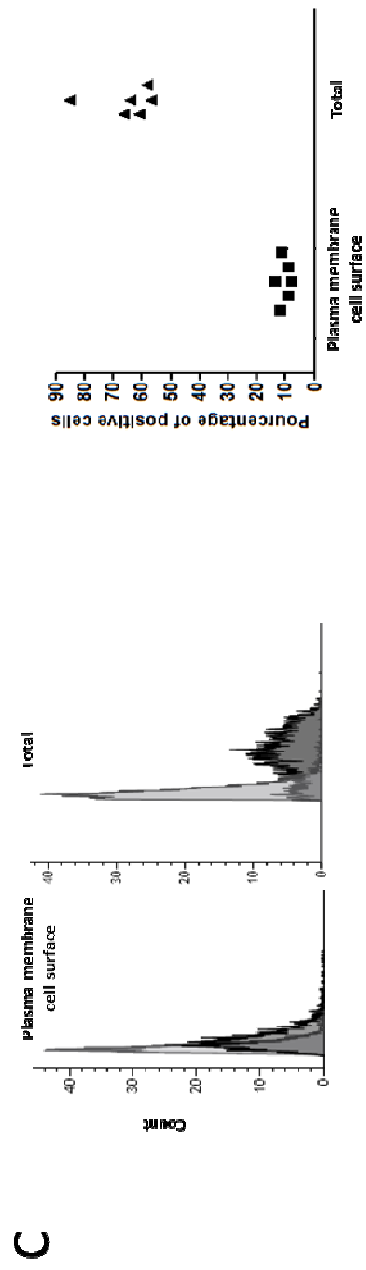
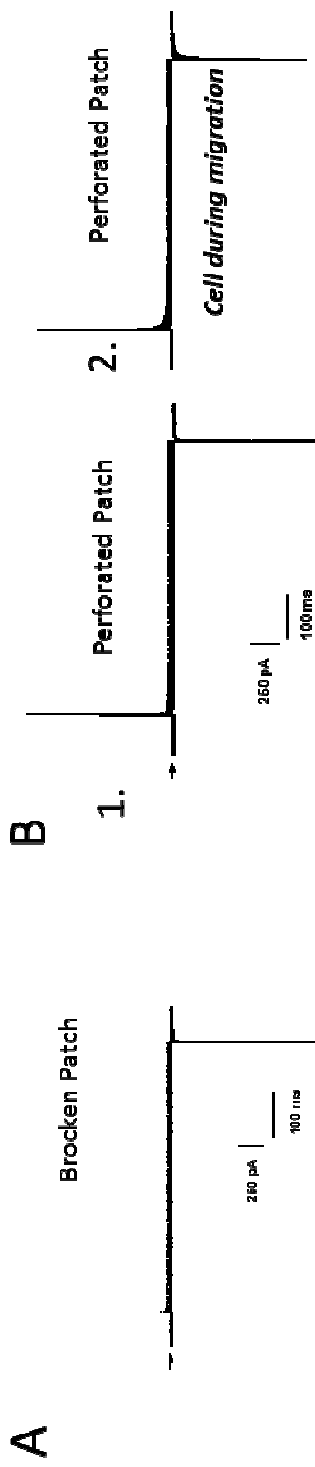


Figure 3

Figure 4

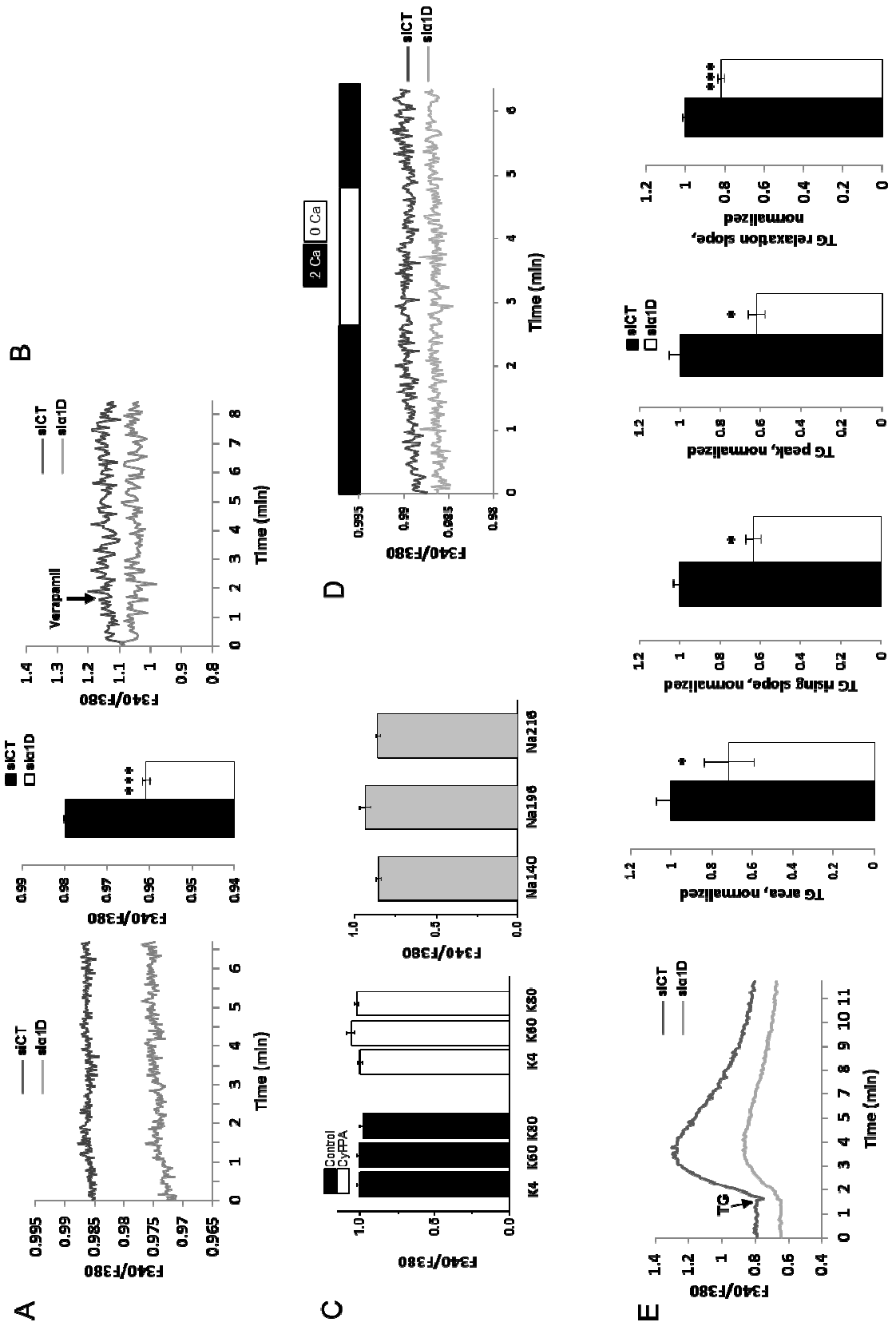
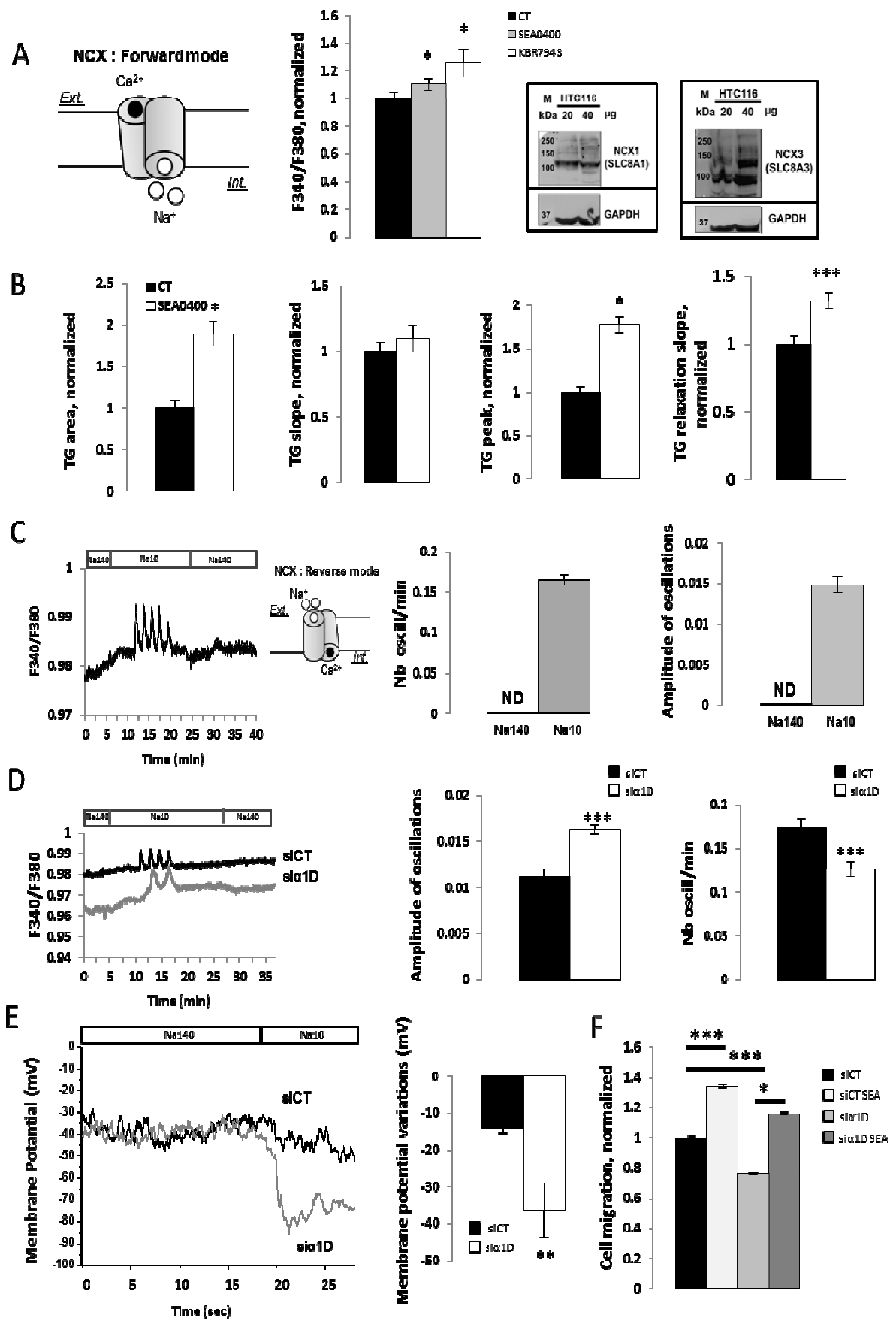


Figure 5



Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity

Yann Fourbon^{1,8*}, Maxime Guéguinou^{1,8*#}, Romain Felix^{1,8*}, Bruno Constantin^{2,8}, Arnaud Uguen^{3,4}, Gaëlle Fromont^{1,7,8}, Laurie Lajoie⁵, Christophe Magaud², Thierry Lecomte^{5,7,8}, Emmanuel Chamorey⁶, Aurélien Chatelier², Olivier Mignen^{3,8}, Marie Potier-Cartereau^{1,8}, Aurélie Chantôme^{1,8*}, Patrick Bois^{2*} and Christophe Vandier^{1,8*}

¹Inserm, UMR 1069, Université François Rabelais Tours, France.

²Equipe ERL 7368 CNRS, Université de Poitiers, France.

³Inserm UMR 1078 IFR148, Université de Bretagne Occidentale, France.

⁴CHRU Brest, France

⁵GICC– UMR 7292 Université de Tours, France.

⁶Unité d'Epidémiologie et Biostatistiques (UEB), Centre Antoine Lacassagne, France.

⁷CHRU Tours, France.

⁸From network “Ion channels and cancer-Canceropole Grand Ouest, (IC-CGO) France (www.ic-cgo.fr).

Supplemental methods

Drugs and Antibodies

Apamin (SK3 blocker), Forskolin (adenylate cyclase activator), Verapamil (Ca²⁺ inhibitor), Nifedipine (Ca²⁺ antagonist belonging to the dihydropyridine), Bayk 8644 (Ca²⁺ channel activator (L-type)), KB-R7943 (Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor (reverse mode), Thapsigargin (a Ca²⁺ ATPase inhibitor), and SEA0400 (Na⁺ / Ca²⁺ exchanger inhibitor, A3811, Cliniscience) were added to the PSS or culture media at the concentrations indicated in the figure legends. Besides SEA0400 and all others drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin, France).

Small interference RNA (SiRNA) transfection assays

Pre-designed siRNAs (sc-42690, Santa Cruz Biotech) named SiRNA α 1D#1 and SiRNA α 1D#2 (5'-GAACUCUUCGCUUUCGAAAtt-3') synthesized by Sigma-Aldrich were used to knock-down α 1D protein of CaV channels. Pre-designed siRNAs (sc-29234, Santa Cruz Biotech) were used to knock-down calregulin. Sequence of non-targeting siRNA (SiCTL) is described previously ²⁰. SiRNAs were delivered to the cells using LipofectamineTM RNAiMAX transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, France) following the manufacturer's protocol. Cells were cultured for 48 hours to obtain optimal silencing of targeted genes.

Western blot

To determine α 1D protein expression, the cells were washed with PBS and whole-cell lysates were prepared with 5% sodium dodecyl sulphate and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Ninety micrograms of total cell lysate were resolved by electrophoresis through a SDS-polyacrylamide gel, which was transferred to HybondTM-P, polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). After blocking with 1% BSA in 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20, the filters were probed with specific antibodies. Anti-CaV1.3 (ACC-311, Alomone, 1/200), Anti-Hsp90 (SC-1057, Santa Cruz Biotech, USA, 1/500) or anti- β -actin (A5441, Sigma Aldrich, 1/10000) were used. The proteins were visualized with peroxidase coupled secondary antibodies using the enhanced chemiluminescence detection system, ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, France) and a CCD camera (MF ChemiBIS, DNR Bio-imaging Systems, Israël). To determine NCX1 and NCX3 proteins expression, HTC116 cellular culture were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed by scraping the cells into a radioimmunoprecipitation assay buffer (in mmol l⁻¹: Tris-HCl 50 pH:8, NaCl 150, EDTA 5, 0.05% Igepal, 1% deoxycholic acid, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) containing

protease and phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich - PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche). Soluble cell lysates were denatured 5 min at 37°C in 2× Laemmli sample buffer (in mmol l⁻¹): Tris-HCl 125 pH:6.8, SDS 4%, glycerol 20%, bromophenol blue 0.004%, β-mercaptoethanol 10%). Protein samples (20 and 40 μg), obtained from HTC116 culture, were separated by SDS-PAGE using 8% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked 1 h 30 in TBS-Tween blocking solution (in mmol l⁻¹: Tris 20 pH : 7.6, NaCl 150 and Tween-20 0.2%) with 5% non-fat milk at room temperature. Blots were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBST-5% nonfat dry milk. We used polyclonal anti-rabbit NCX1 or NCX3 (1:200, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). GAPDH was probed by mouse monoclonal anti-GAPDH (1:5000, HyTest, Turku, Finlande). Membranes were washed with TBS-Tween three times for 10 min and then incubated for 1 h 30 at room temperature with specific anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000, Interchim, Montluçon, France). Membranes were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) chemiluminescent substrate (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The results were analyzed by using the GeneGnome Imager (SynGene Ozyme, Montigny - Bretonneux, France).

Cell viability

Cell viability was determined using the tetrazolium salt reduction method (MTT). Cells were seeded on 24-well plates at a density of 60,000 cells per well and after 4 h drugs were added. Measurements were performed in triplicate 24 hours after treatment as described previously³⁷.

qPCR

Reverse transcription-qPCR experiments were done according to standard protocols. Briefly, total RNAs were extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) and used for

cDNA synthesis using PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Ozyme, France). Quantitative PCR was performed using SYBR® Premix ExTaq™ (Takara) with the LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and with the following parameters: 45 cycles of 10 sec at 95 °C, 30 sec at 60 °C and 20 sec at 72°C. The experiments were performed in triplicate, the amplifications were analyzed with the LC480 software. The analysis of relative mRNA levels was performed using a delta-CT (Δ Ct) relative quantification model with HPRT as a reference gene. Each value is expressed as fold change relative to the mRNA level of the control value. Amplifications were performed using the sequences described in Table 4.

Table 4 : Primer sequence. F : Forward primer, R: Reverse primer.

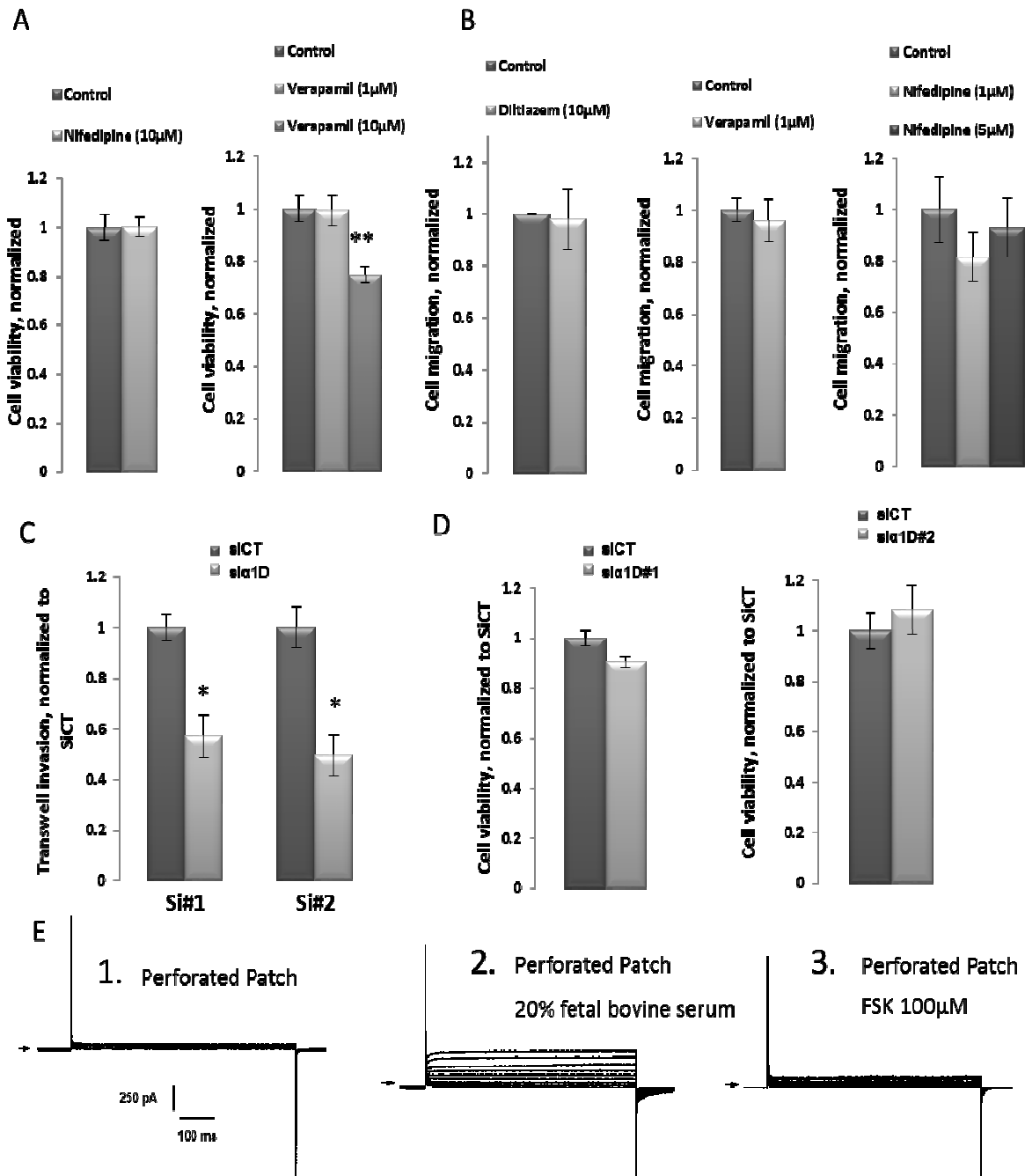
Gene	Access no.	Primer pairs 5'-3'	Amplicon size (bp)
CACNA1D (1D)	NM_000720.3	AAGCTGAGGACATCGATCCG GTCTCCACCAGCACCAGAGA	162
CACNB2	NM_000723.4 NM_199247.2 NM_199248.2	F TATTCCAGCAAACCACCGCT R ATCTGTGACCTCGTAGCCCT	181
CACNB3	NM_000725.3 NM_001206915.1 NM_001206916.1 NM_001206917.1	F ACCAAAGGTA CTCCAGCGTC R GTGGGCACTGAACCAGCTTA	101
CACNB4	NM_001320722.1 NM_001145798.1 NM_001005747.2 NM_001005746.2 NM_000726.3	F GACATTCCGAGCAACTCCCA R TCCCATCAAACCTGTGCTTCA	188
HPRT	NM_000194.2	F TGACCTTGATTTATTTTGCA TACC R CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	102

Statistics

Statistical analyses have been performed using SigmaStat software (version 3.0.1a, Systat Software, Inc) or StatView software (for Immunohistochemistry analyses, version 5.0, Abacus Concepts, Berkeley, CA). Unless otherwise indicated, data were expressed as mean \pm standard error of the mean (n, number of cells from independent experiments). For comparison between more than two means we used Kruskal-Wallis one way analysis of variance followed by Dunn's or Dunnet's post hoc tests as appropriate. Comparisons between two means were made using Mann-Whitney tests.

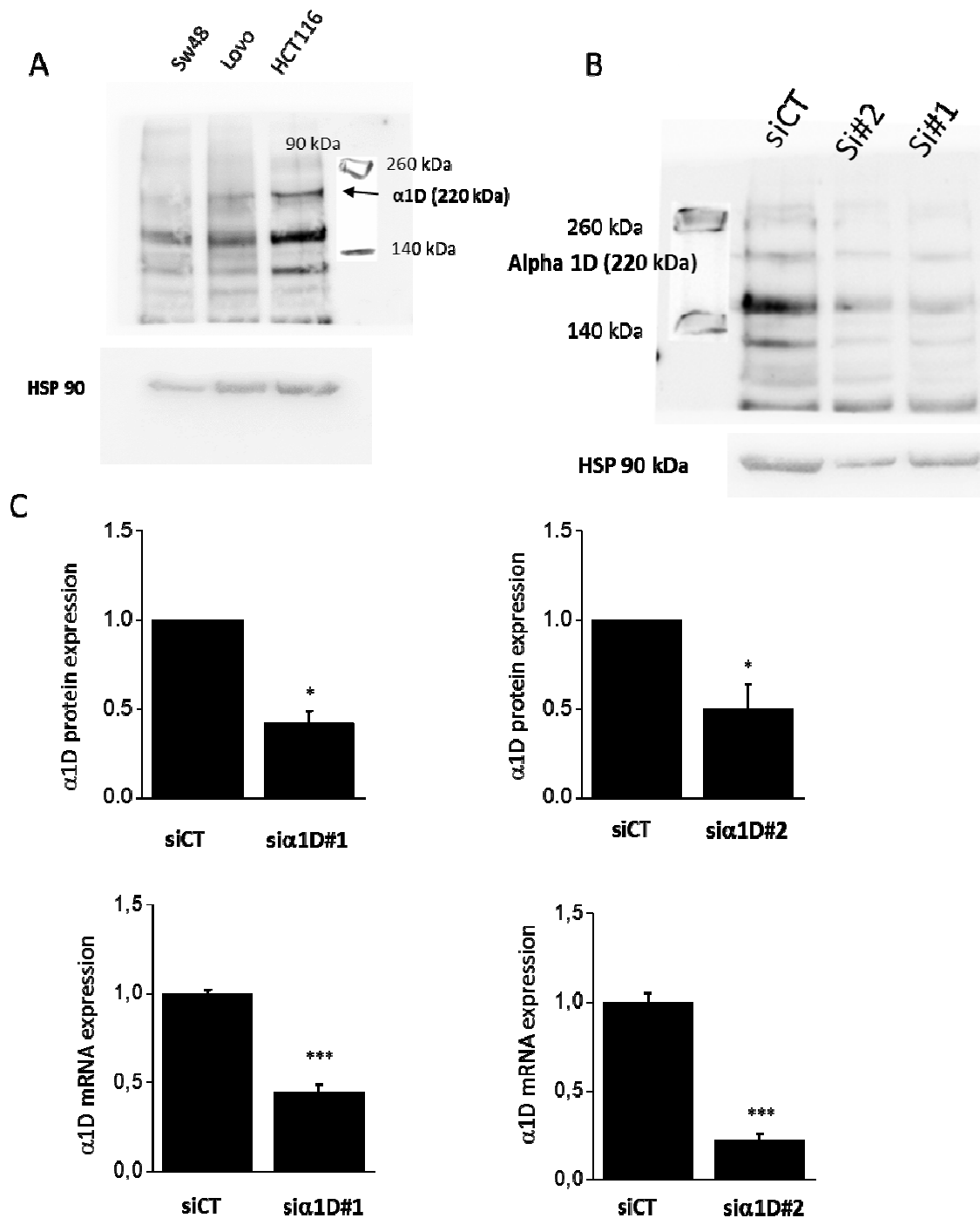
For Immunohistochemistry analyses comparison between groups was performed using the χ^2 test and Kruskal wallis ordinal test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1. A, Histograms showing the effect of verapamil and nifedipine on HCT116 cancer cell viability. The normalized cell number corresponds to the ratio of total number of cells in presence of drugs / total number of cells in control experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.005$, $N = 3$, $n = 9$, Kruskal-Wallis one way analysis of variance). B, Histograms showing the effect of diltiazem ($p > 0.05$, $N = 3$, $n = 9$, Mann Whitney test), verapamil ($p > 0.05$, $N = 3$, $n = 9$, Mann Whitney test), and nifedipine ($p > 0.05$, $N = 3$, $n = 9$, Kruskal-Wallis one way analysis of variance) on HCT116 cancer cell migration using inserts. The normalized cell number corresponds to the ratio of total number of cells in presence of drugs / total number of cells in control experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M. C, Histograms showing the effect of silencing α 1D on transwell invasion of HCT116 using 2 different siRNA (#1 and #2). Results are normalized to siCT and are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control ($p = 0.05$, $N = 3$, $n = 9$, for si#1 and $p = 0.05$, $N = 3$, $n = 3$, for si#2, Mann Whitney test). D, Histograms showing the effect of siRNA #1 and #2 on HCT116 cancer cell viability. Results are normalized to siCT and are expressed as mean \pm S.E.M. ($p > 0.05$, $N = 5$, $n = 15$, for si#1 and $N = 4$, $n = 12$, for si#2, Mann Whitney test). E, Current records during 600 ms pulses in the range of -70 to 110 mV from holding potential of -100 mV. Representative examples of current recording in presence of barium (20 mM) and Bayk 8644 (50 μ M) in perforated patch configurations. Whole cell currents are obtained in normal condition (E.1, $n=4$), in the presence of 20% fetal bovine serum (E.2, $n = 3$) and with 100 μ M FSK (E.3, $n = 2$). Arrows indicates zero current.

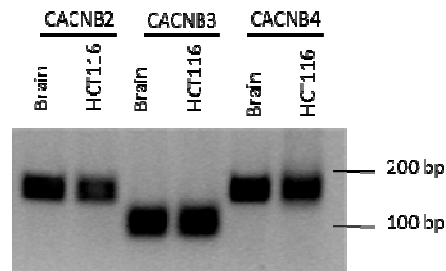
Supplemental Figure 2



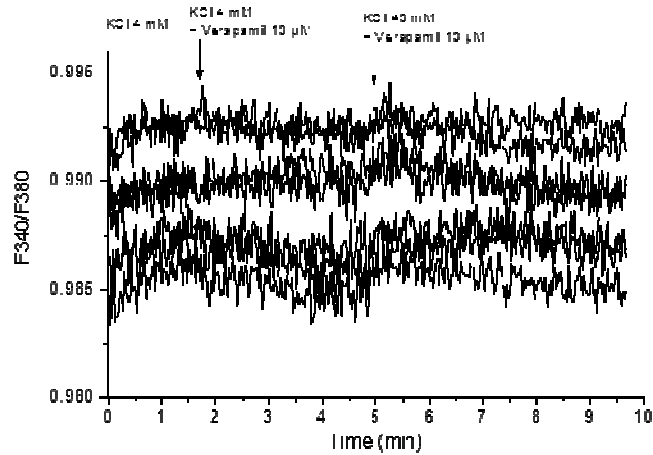
Supplemental Figure 2. A, Full-length Western blot of α 1D protein expression in colon cancer cell lines (N = 3). B, Full-length Western blot of α 1D protein expression after α 1D protein extinction 48 h after transfection. C, α 1D protein (top) and mRNA (bottom) expression in HCT116 cancer cell line following α 1D silencing with siRNA1 and siRNA2. The normalized mRNA and protein correspond to the ratio of / in control conditions. Results are expressed as mean \pm S.E.M. α 1D protein, * significantly different from control ($p < 0.05$, N = 3 for si α 1D #1 and si α 1D #2, Mann Whitney test). α 1D mRNA, *** significantly different from control ($p = 0.001$, N = 5, n = 15 for si α 1D #1, N = 3, n = 9 for si α 1D #2, Mann Whitney test).

Supplemental Figure 3

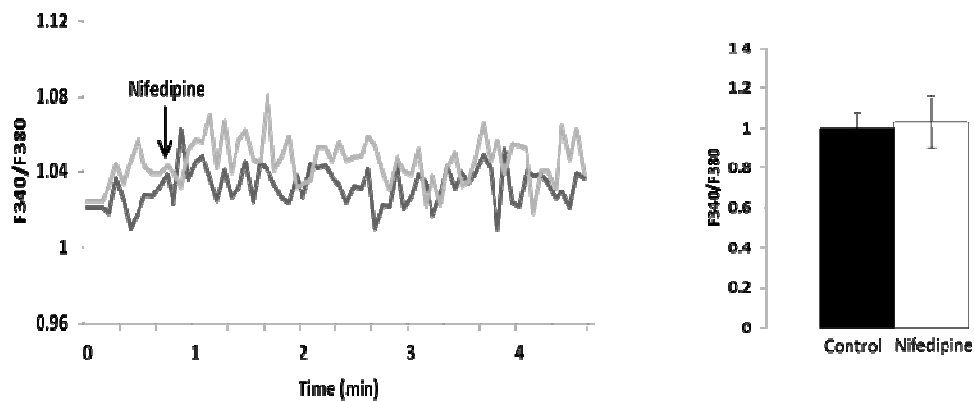
A



B

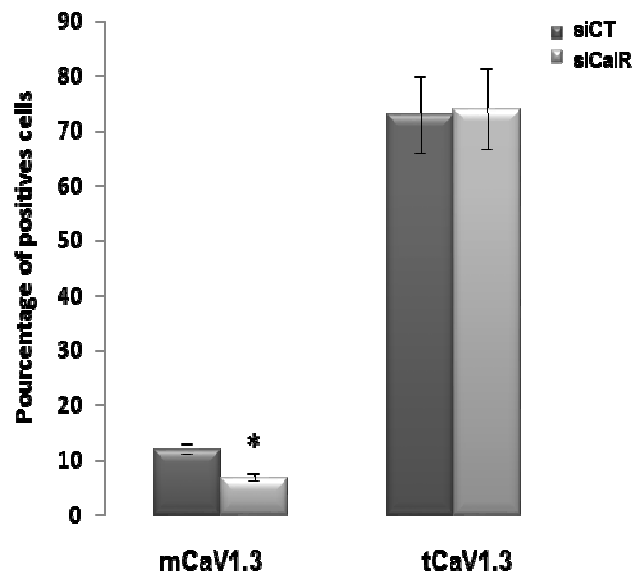


C



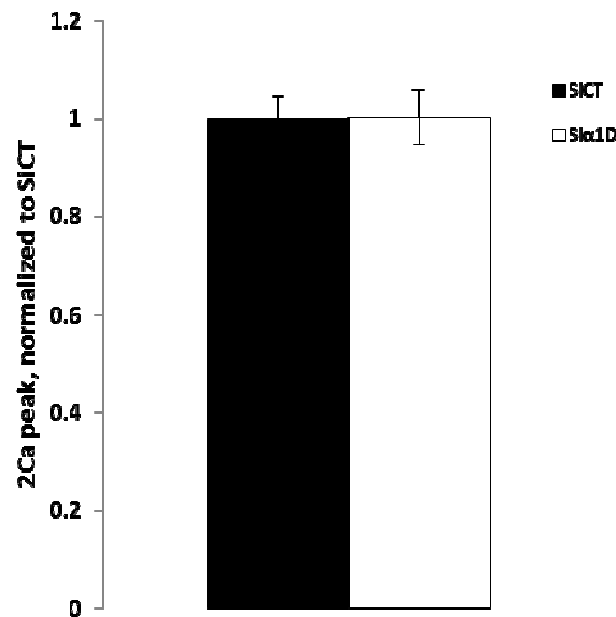
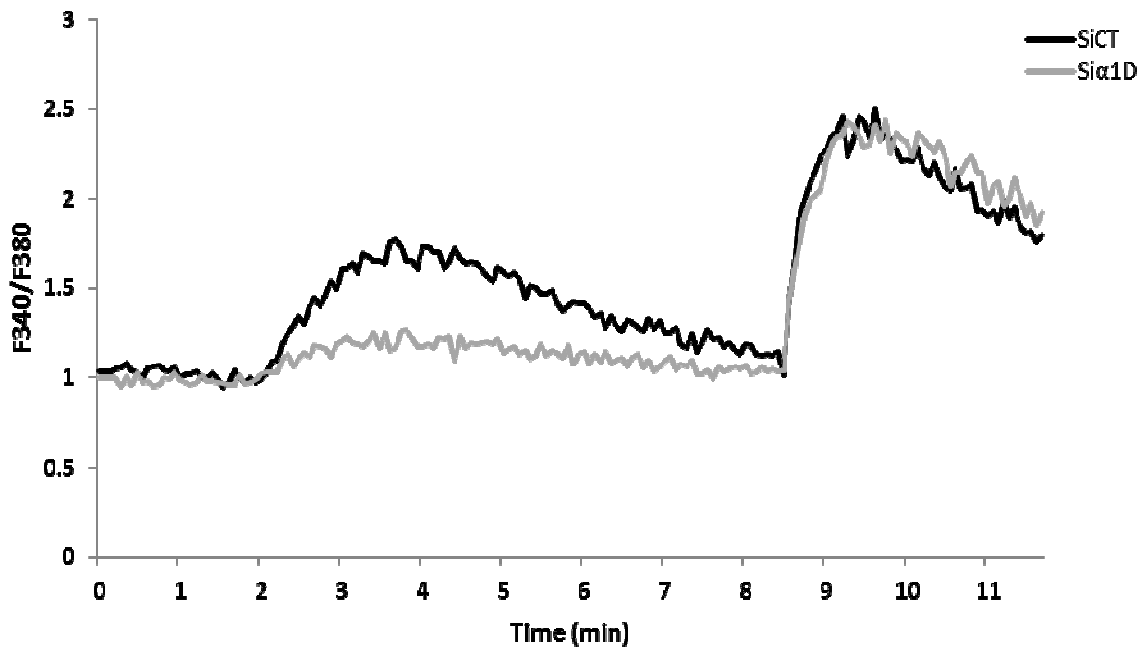
Supplemental Figure 3. A, CACNB expression in HCT116 cancer cell line. RT-PCR products from total RNA extracts using primers specific for the human CACNB2-4 mRNAs. Brain cDNA was used as a positive control. B, Examples of F340/F380 traces recorded in the presence of 10 μM verapamil (acute application) in K4 or K40 solutions (N=3, n=45). C, Examples of F340/F380 traces recorded in the presence of 10 μM nifedipine (acute application) in K4 solution. The histogram show mean ± S.E.M (N = 2, n = 8).

Supplemental Figure 4



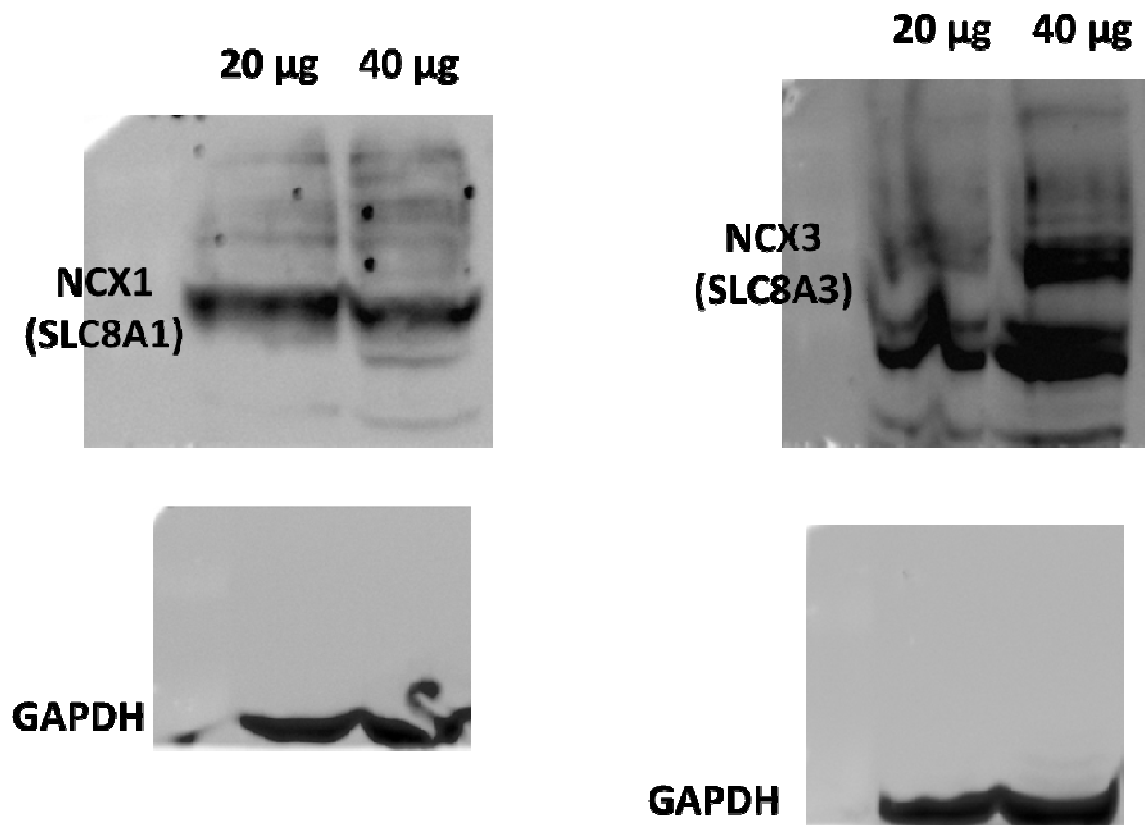
Supplemental Figure 4. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of α 1D proteins in HCT116 cell line with an siRNA directed against calreticulin (siCalR). Permeabilized and not permeabilized cells were stained with an anti-CaV1.3 or an isotype-matched non-binding control mAb. Histograms represent the percentage of cells expressing α 1D protein in permeabilized (tCaV1.3) and not permeabilized (mCaV1.3) cells. Results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from si control condition ($p = 0.011$, $N = 3$, Mann Whitney test).

Supplemental Figure 5



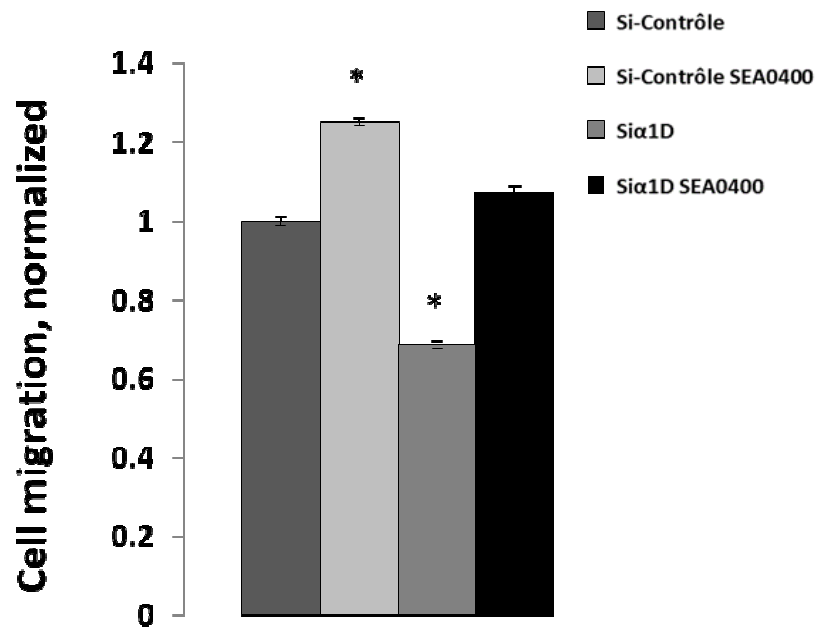
Supplemental Figure 5. Silencing $\alpha 1D$ with siRNA #1 has no effect on SOCE of HCT-116 cells. Top, typical example of SOCE trace and bottom are means \pm SEM. SOCE measurements were performed using the ratiometric fluorescent dye Fura2-AM ($5\mu M$). Cells were suspended in PSS Ca^{2+} -free solution and treated with thapsigargin ($4\mu M$) to deplete the intracellular store depletion before injection of $2\text{ mM } CaCl_2$ solution.

Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 6. Full-length Western blot of NCX1 and NCX3 in HCT116 colon cancer cells.

Supplemental Figure 7



Supplemental Figure 7. Effect of silencing $\alpha 1D$ in presence or not of 1 μM SEA0400 on migration of LoVo cells (wound-healing cell migration assays). Results are normalized to si control conditions and results are expressed as mean \pm S.E.M. * significantly different from control (N=4, n=26, $p < 0.001$, Kruskal-Wallis one way analysis of variance and post hoc Dunnett's test).

Résultats complémentaires et Discussion

Nos résultats montrent que la protéine $\alpha 1D$ est impliquée dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} ainsi que dans la migration/invasion des HCT-116 par un mécanisme indépendant de sa fonction canonique à la membrane plasmique. En effet, aucun courant Ca^{2+} n'a pu être enregistré en patch-clamp et aucune augmentation de concentration de Ca^{2+} cytosolique n'a pu être observée suite à une dépolarisation membranaire provoquée par une augmentation de la concentration de K^+ extracellulaire. Afin d'être sûr que l'absence de courants Ca^{2+} n'était pas liée à un problème de solutions utilisées (PSS et MIP) en patch-clamp, nous avons testé ces solutions sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat, en configuration de patch rompu. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Claire Malécot, laboratoire CNRS ERL 7368 Poitiers-Tours et sont présentés en figure 30.

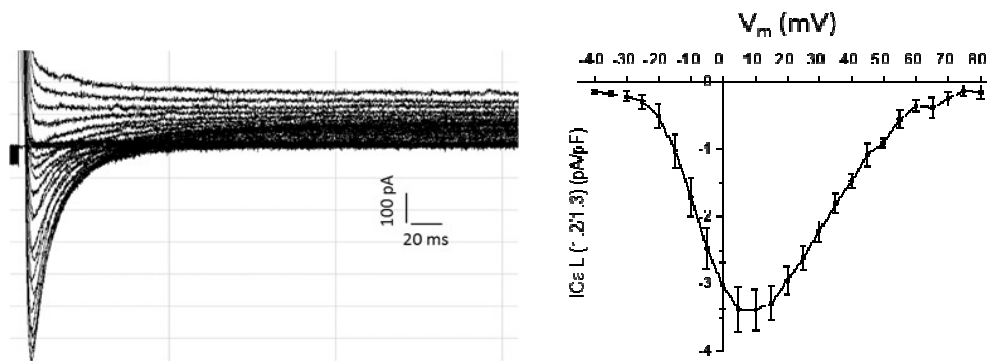


Figure 30 : Courants Ca^{2+} de type L obtenus sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat en configuration whole-cell de patch rompu.

Les acquisitions ont été faites durant 600 ms, avec un potentiel de maintien à -100 mV avec un protocole de créneaux dépolarisants de -60 mV à + 90 mV. A gauche, exemple d'enregistrement des courants Ca^{2+} de type L obtenus. A droite, représentation I/V moyennée des courants Ca^{2+} de type L obtenus (N = 4).

Sur ce type cellulaire, nos solutions nous ont permis de mesurer des courants entrants de types $CaV1.2$ démontrant que l'absence de courant Ca^{2+} n'était pas liée aux solutions utilisées. Bien que la protéine $\alpha 1D$ soit exprimée à la membrane plasmique cela ne concerne que 10 % des cellules testées. Ainsi, l'absence de courant Ca^{2+} est soit liée à une absence d'activité canalaire de la protéine $\alpha 1D$ localisée à la membrane plasmique sur ces 10% de cellules, soit liée à la faible proportion de cellules exprimant la protéine $\alpha 1D$ à la membrane plasmique diminuant alors nos chances de mesurer un courant Ca^{2+} , ou d'avoir une réponse Ca^{2+} après dépolarisation des cellules.

Nous avons émis l'hypothèse que cette absence d'activité canalaire pouvait être liée à un défaut d'expression de la sous-unité accessoire $\beta 3$, sous-unité connue pour favoriser

l'adressage des canaux CaVs à la membrane plasmique (Bichet *et al.*, 2000). Les transcrits de la sous-unité $\beta 3$ ont pourtant été détectés (Figure Supplémentaire 3 A de l'article) mais il faudrait cependant s'assurer que la protéine $\beta 3$ est quant à elle bien exprimée. Nous avons également testé le rôle de la calréticuline. Cette dernière est connue pour réguler négativement l'expression à la surface membranaire de la protéine $\alpha 1D$ en la séquestrant dans le RE (Karnabi *et al.*, 2014). La suppression de la calréticuline n'a pas augmenté le nombre de cellules exprimant la protéine $\alpha 1D$, suggérant que dans notre modèle la calréticuline n'est pas impliquée dans son adressage à la membrane plasmique (Figure Supplémentaire 4 de l'article). Il serait également intéressant de tester le rôle de l' α -actinine qui a été décrite comme potentialisant l'activité de la protéine $\alpha 1C$ du canal CaV1.2 (Tseng *et al.*, 2017). La protéine $\alpha 1D$ n'a pas non plus montré d'activité lors des tests de dépolarisation de la membrane plasmique avec l'augmentation de la concentration de K^+ extracellulaire (Figure 4 C de l'article). Cette augmentation jusqu'à 80 mM en présence ou non de CyPPA n'a pas provoqué de changement de la concentration de Ca^{2+} basale cytosolique. Toutes ces données suggèrent que l'absence de courant Ca^{2+} serait liée à un défaut d'adressage de la protéine $\alpha 1D$ à la membrane plasmique et/ou associée à l'absence de fonction canonique de la protéine $\alpha 1D$ à la membrane plasmique. Il est également possible que la protéine $\alpha 1D$ soit un variant particulier dans notre modèle cellulaire. Il serait donc intéressant de cloner et de séquencer l'ADNc correspondant afin d'identifier la séquence exacte de la protéine.

Enfin, il a été décrit l'existence d'une protéine $\alpha 1D$ tronquée sur l'extrémité C-terminale qui possède une sensibilité modifiée pour les bloqueurs pharmacologiques (Huang *et al.*, 2013). En effet, l'épissage alternatif de l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1D$, en plus de modifier les propriétés électrophysiologiques du canal, a été montré comme pouvant aussi affecter sa sensibilité pour les dihydropyridines (Huang *et al.*, 2013). Cependant, si l'existence de cette forme tronquée pourrait expliquer l'absence d'effets des bloqueurs pharmacologiques elle ne peut pas expliquer l'absence d'activité canalaire de l' $\alpha 1D$ car cette dernière possède une activité canal.

Nous avons montré que l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} régule le potentiel de membrane des cellules HCT-116 seulement lorsque l'expression de la protéine $\alpha 1D$ est supprimée par siRNA suggérant que la protéine $\alpha 1D$ de la membrane plasmique régule l'activité de l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} (Figure 5 E de l'article). En effet, nos données montrent que la protéine $\alpha 1D$ contrôle la concentration Ca^{2+} cytosolique basale et induite par la TG des cellules HCT-116 en inhibant l'activité de l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} . Les échangeurs NCX1 et NCX3 se sont révélés être

exprimés dans les cellules cancéreuses HCT-116 (Figure Supplémentaire 6 de l'article). L'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ permet d'extruder le Ca^{2+} hors du cytosol, régulant ainsi sa concentration basale et celle induite par la TG. En bloquant l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ la concentration cytosolique de Ca^{2+} augmente ou se prolonge lors de l'addition de TG (Figure 5 B de l'article). Il est possible que la protéine $\alpha 1\text{D}$ interagisse directement avec $\text{NCX1} / 3$ comme cela a déjà été décrit entre les canaux TRP et l'échangeur NCX1 (Eder *et al.*, 2007). Il a été observé que l'extrémité C-terminale des protéines $\alpha 1\text{D}$ et $\alpha 1\text{C}$ (séquence très proche de l' $\alpha 1\text{D}$) peut être transloquée dans le noyau, agir comme facteur de transcription et réguler l'expression de nombreux gènes (Lu *et al.*, 2015 ; Gomez-ospina *et al.*, 2006). Il a notamment été montré que l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{C}$ inhibe la transcription de l'échangeur NCX1 dans des cellules neuronales. Dans les cellules HCT-116, il est donc possible que l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{D}$ agisse comme facteur de transcription et régule négativement les échangeurs NCXs . Nous avons tenté de rechercher l'effet de l'extinction de la sous-unité $\alpha 1\text{D}$ sur l'expression de l'échangeur NCX1 . Malheureusement, les résultats n'ont pas été reproductibles à cause de la faible expression du NCX1 . Par ailleurs, il serait intéressant de tester également l'expression du NCX3 dont l'expression est plus importante dans les HCT-116. Une étude a montré que l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{D}$ inhibe la transcription de la chaîne légère de la myosine, MLC2 , protéine indispensable pour la localisation membranaire du canal SK2 dans les myocytes de souris (Lu *et al.*, 2015). Il est donc également possible que l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{D}$ transloquée au noyau agisse sur l'expression d'une protéine qui régule la localisation ou l'activité de l'échangeur $\text{NCX1} / 3$. A l'aide d'un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{D}$, nous avons recherché la présence du fragment C-terminale par western-blot sur des extraits protéiques totaux (Figure 31).

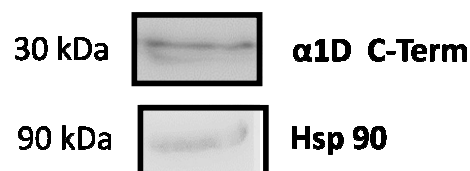


Figure 31 : **Expression de la partie C-terminale de la protéine CaV1.3 dans les HCT-116.** Western-blot représentant l'expression de la partie C-terminale du CaV1.3 . N=1.

La figure 31 montre que l'anticorps a détecté une protéine d'environ 30 KDa, poids moléculaire pouvant correspondre à la partie C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{D}$. Il serait primordial de répéter cette expérience sur une préparation d'extrait protéique nucléaire. En fonction du type cellulaire, la partie C-terminale de la protéine $\alpha 1\text{C}$ peut être issue d'un

clivage du canal (Hulme *et al.*, 2006) ou directement de la transcription d'un variant par l'intermédiaire d'un promoteur exonique (Gomez-ospina *et al.*, 2013). En ce qui concerne l'origine de la partie C-terminale de la protéine $\alpha 1D$, aucune donnée n'est actuellement disponible. L'utilisation d'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine, révèle une protéine aux alentours de 220 kDa et une autre aux alentours de 175 kDa (Figure Supplémentaire 2 A de l'article). Il est donc possible que la protéine $\alpha 1D$ soit clivée. Néanmoins, la taille du fragment généré serait bien supérieure à celle observée figure 31. Des expériences futures sont donc nécessaires pour déterminer comment la protéine $\alpha 1D$ agit sur les échangeurs NCXs.

Le canal SK3 favorise la migration des cellules de cancer du sein MDA-MB-435s et des cellules cancéreuses du côlon HCT-116 (Potier *et al.*, 2006 ; Guéguinou *et al.*, 2016). Ce canal en régulant le potentiel de membrane et la concentration de Ca^{2+} cytosolique favorise l'entrée de Ca^{2+} par les canaux Ca^{2+} non dépendant du potentiel comme les canaux Orai1 dans les cellules MDA-MB-435s et les canaux Orai1 et TRPC1 dans les cellules HCT-116 (Guéguinou *et al.*, 2014 ; Guéguinou *et al.*, 2016). Afin d'évaluer l'effet de la régulation de la voie AMPc-PKA sur le canal SK3, nous avons testé l'effet de FSK + CI-1044 et de l'isoprénaline (ISO) sur la migration des HCT-116. Il a déjà été montré au laboratoire qu'un traitement des cellules avec la FSK + CI-1044 réduisait la migration des MDA-MB-435s (Clarysse *et al.*, 2013). La figure 32 montre que l'application de FSK + CI-1044 diminue la migration des HCT-116 de près de 40%. Egalement, l'application d'ISO (100 nM) et de CI-1044 (100 μ M) diminue cette migration des HCT-116 de 25%.

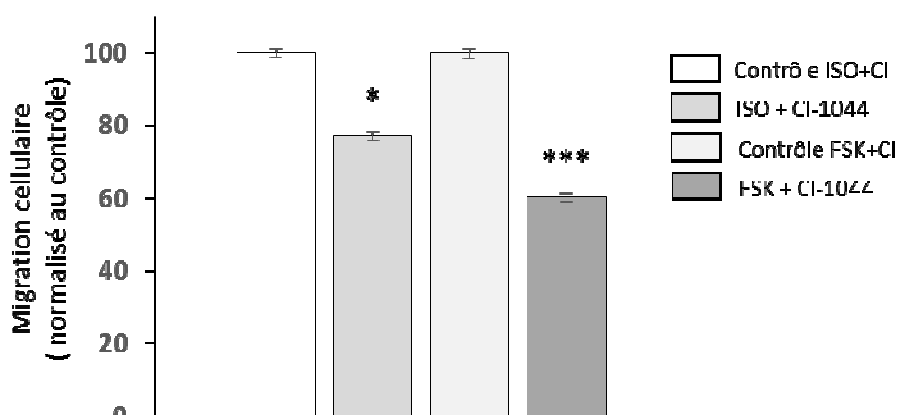


Figure 32 : Effets de ISO + CI-1044 et de FSK + CI-1044 sur la migration des HCT-116.

Test de migration en wound-healing avec et sans traitement avec ISO (100 nM) + CI-1044 (100 μ M) et de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) sur 12 heures. * indique une différence significative $p < 0,05$ (test de Mann-Whitney (ISO + CI-1044 : N = 2, n = 5) (FSK + CI-1044 : N = 3, n = 9).

La protéine $\alpha 1D$ favorise la migration des cellules HCT-116 ainsi que le canal SK3 (Guéguinou *et al.*, 2016). Ce canal en régulant le potentiel de membrane (hyperpolarisation) favorise les entrées de Ca^{2+} dépendantes des réserves du RE en Ca^{2+} (SOCE pour Store Operated Ca^{2+} entry) par les canaux Ca^{2+} non dépendant du potentiel que sont les canaux Orai1 et TRPC1 (Guéguinou *et al.*, 2014 ; Guéguinou *et al.*, 2016). Le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$ contrôleraient donc la migration des HCT-116 probablement en régulant différemment l'homéostasie Ca^{2+} intracellulaire. En effet, contrairement au canal SK3, la sous-unité $\alpha 1D$ ne régule pas les SOCE dans ces cellules (Figure Supplémentaire 5 de l'article). Comme il a été montré que l'activation de la voie AMPc-PKA, par la FSK + CI, réduisait la migration cellulaire en inhibant le canal SK3 (Clarysse *et al.*, 2013), nous avons testé l'effet de la FSK + CI sur la migration dépendante de la protéine $\alpha 1D$ des HCT-116. La figure 33 montre que l'invalidation de l'expression de SK3 ou de la protéine $\alpha 1D$ réduit la migration de ces cellules. Alors que la suppression de SK3 supprime l'effet de la FSK + CI-1044 sur la migration, il y a toujours un effet sur la migration après invalidation de la protéine $\alpha 1D$ (Figure 33). Ces résultats suggèrent que la réduction de la migration cellulaire par la voie AMPc-PKA est liée à l'inhibition de SK3 mais pas à l'inhibition de la protéine $\alpha 1D$ montrant que le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$ régulent différemment la capacité à migrer des HCT-116.

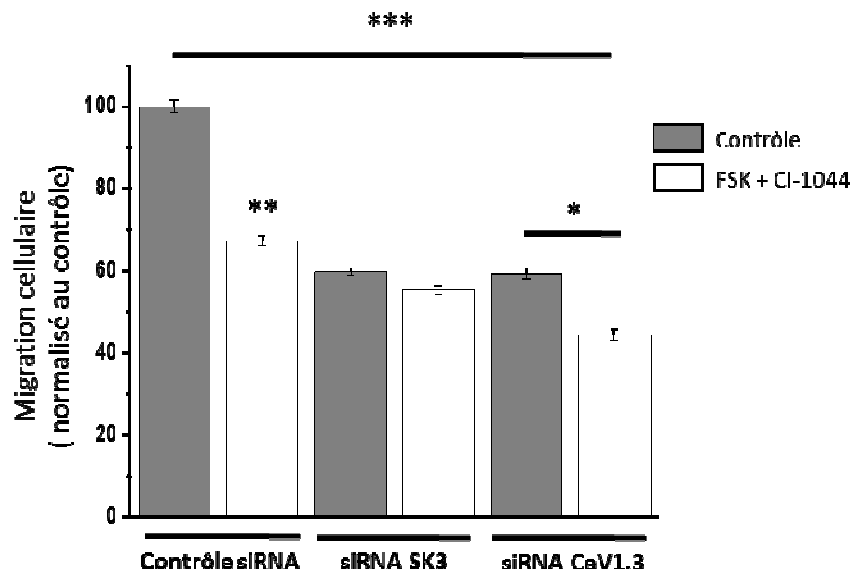


Figure 33 : Effets de FSK + CI-1044 sur la migration des HCT-116 dépendante des canaux CaV1.3 et SK3.

Utilisation de siRNA CaV1.3 et SK3 en test de migration en wound-healing avec et sans traitement avec FSK (10 μM) + CI-1044 (100 μM) sur 12 heures. *** indique une différence significative $p < 0,001$ (test en ANOVA, Kruskal Wallis ($p = <0,001$) (N = 3, n = 9).

Nos résultats montrent que la protéine $\alpha 1D$ intervient dans la migration des cellules cancéreuses du côlon HCT-116 en régulant la concentration du Ca^{2+} intracellulaire. Cette

homéostasie Ca^{2+} est maintenue par l'échangeur NCX sous contrôle de la protéine $\alpha 1\text{D}$. La protéine $\alpha 1\text{D}$ est surexprimée dans les adénocarcinomes par rapport aux adénomes et tissus sains. Afin de confirmer le rôle protéine $\alpha 1\text{D}$ dans des cellules isolées d'adénocarcinome (les HCT-116 étant issues de carcinome) nous avons testé l'expression de la protéine $\alpha 1\text{D}$ dans d'autres lignées de cancer du côlon et son rôle dans la migration de cellules issues d'adénocarcinome. La figure 34 montre que la protéine $\alpha 1\text{D}$ est exprimée dans 3 autres lignées de cancer du côlon (Figure 34). Les LoVo étant issues d'adénocarcinome et exprimant également SK3 (données non montrées de Maxime Guéguinou) nous avons testé dans ces cellules le rôle de la protéine $\alpha 1\text{D}$ dans leur capacité à migrer.

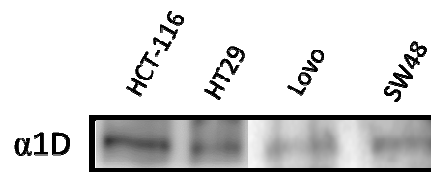


Figure 34 : Expression de la protéine $\alpha 1\text{D}$ dans différentes lignées cancéreuses coliques.

La figure 35 montre que le SEA0400 augmente la migration des cellules LoVo dans les conditions contrôles ou bien en absence de la protéine $\alpha 1\text{D}$. Par ailleurs, comme observé avec les cellules HCT-116, l'extinction de la protéine $\alpha 1\text{D}$ réduit la migration des LoVo. Ces résultats sont similaires à ceux observés sur les HCT-116 montrant que la protéine $\alpha 1\text{D}$ favorise la migration des cellules issues d'un adénocarcinome.

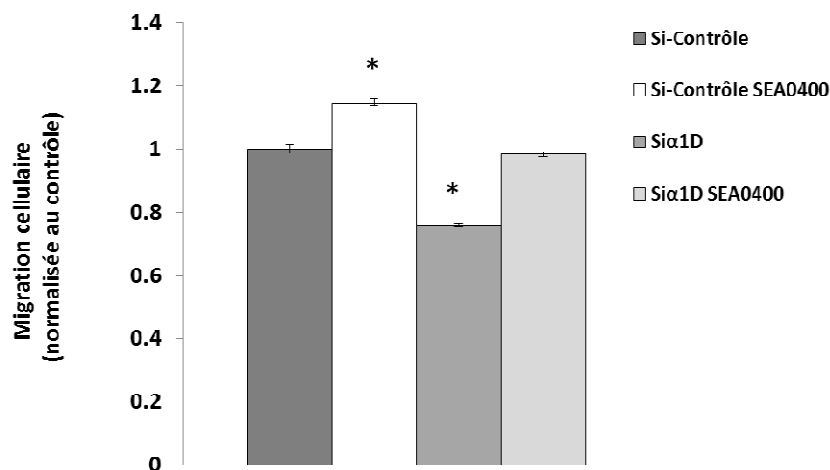


Figure 35 : Effets du SEA0400 sur la migration des LoVo.

Effet de l'extinction de la protéine $\alpha 1\text{D}$ avec un siRNA $\alpha 1\text{D}$ (siRNA n°2) sur la migration en (wound-healing) avec et sans traitement avec le SEA0400 à $1 \mu\text{M}$ pendant 12 heures. *** indique une différence significative $p < 0,001$ (test en ANOVA, Kruskal Wallis ($p < 0,001$)) ($N = 4$, $n = 26$).

Ces résultats suggèrent également que l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ intervient dans la migration des cellules cancéreuses du côlon LoVo, tout comme dans la migration des cellules HCT-116, en régulant la concentration de Ca^{2+} intracellulaire.

Ainsi, tout porte à penser que la protéine $\alpha 1\text{D}$ régulerait la concentration de Ca^{2+} et la migration de la plupart des cellules épithéliales de cancer du côlon. Néanmoins, pour confirmer ces premiers résultats, d'autres expérimentations seraient nécessaires pour vérifier ces hypothèses, comme de tester si la sous-unité $\alpha 1\text{D}$ régule la concentration de Ca^{2+} basal des cellules LoVo et si c'est en inhibant l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ et en favorisant les sorties de Ca^{2+} du RE comme ce qui avait été observé chez les HCT-116. De même, la question de la localisation précise de cette sous-unité $\alpha 1\text{D}$ au sein des LoVo et également le fait que cette sous-unité puisse former ou non un canal Ca^{2+} à la membrane plasmique des cellules restent à être élucidées.

Résultats partie II

Régulation de l'activité du canal SK3 par l'activation de la voie AMPc-PKA et l'effet de l'Ohmline

I). Rôle de la sérine 285 dans la sensibilité du canal rSK3 à la PKA

1.1) Etudes électrophysiologiques

Il a été montré lors des travaux de thèse de Lucie Clarysse, que l'activation de la voie AMPc-PKA suite à l'application de 10 μ M de forskoline et de 100 μ M de CI-1044 (FSK + CI-1044) réduisait de 90% l'activité du canal rSK3 (surexprimé dans les cellules HEK293T) et la migration des cellules MDA-MB-435s (Clarysse *et al.*, 2013). Cet effet est le résultat de la phosphorylation de la protéine SK3 par la PKA sur un ou des résidus sérine non identifiés à l'époque (Clarysse *et al.*, 2013). Nous avons recherché quels résidus sérine de rSK3 pouvaient être la cible de la PKA. En parallèle, il a été montré que la FSK + CI-1044 réduisaient également l'activité des canaux SK1 et SK2 suggérant que la PKA pourrait agir sur une sérine commune aux trois canaux (Thèse Lucie Clarysse, 2014). Sept résidus sérine situés sur les domaines N- et C-terminaux cytoplasmiques du canal SK3 peuvent être la cible de la PKA (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK ; <http://mendel.imp.ac.at/pkaPS>). Parmi ces sérines, seule celle située dans la région N-terminale du canal, la Ser285, est commune à toutes les protéines SK1, SK2 et SK3 (voir l'alignement de séquence en figure 36).

SE sp P70605 KCNN3_RAT	LFEKRKRLSDYALIFGMFGIVVM
SE sp Q9UGI6 KCNN3_HUMAIN	LFEKRKRLSDYALIFGMFGIVVM
SE sp P70604 KCNN2_RAT	LFEKRKRLSDYALIFGMFGIVVM
SE sp Q92952 KCNN1_HUMAIN	LFEKRKRLSDYALIFGMFGIVVM
SE sp O15554 KCNN4_HUMAIN	LLEQEKSLAGWALVLAGTGIGIM

Figure 36 : Homologie de séquence comparée des isoformes des SKCa.

Représentation de l'alignement d'une partie de séquence en acides aminés montrant une homologie de séquence (soulignée, avec la sérine 285 commune en gras) entre les isoformes des canaux SKCa entre les espèces rat et humaine. Séquences avec le site consensus PKA RX1-2 (pS/pT) X or RRX (pS/pT) X.

Par conséquent, nous avons substitué la sérine 285 de la protéine rSK3 par une alanine par la technique de mutagenèse dirigée, aboutissant ainsi au développement d'un canal mutant rSK3 S285A. La figure 37, illustre en condition contrôle, un courant rSK3 témoin (non muté) et un courant rSK3 S285A (muté S285A). Les courants rSK3 et rSK3 S285A sont des courants sortants qui rectifient dans le sens entrant pour des potentiels de membrane supérieurs à 0 mV et avec un potentiel d'inversion (identique au potentiel de membrane de repos) de $-76,6 \pm 2,4$ mV pour rSK3 (N=10) et $-68,8 \pm 4,1$ mV pour les rSK3 S285A (N=5) (différence non significative test de Mann-Whitney $p > 0,05$). Au niveau de la conductance, nous n'obtenons pas de différence significative entre les deux canaux, avec une conductance

membranaire moyennée de $17,3 \pm 2,6$ nS pour le rSK3 (N = 10) et de $18,8 \pm 2,6$ nS pour le canal rSK3 285A (N = 5) (test de Mann-Whitney $p > 0,05$).

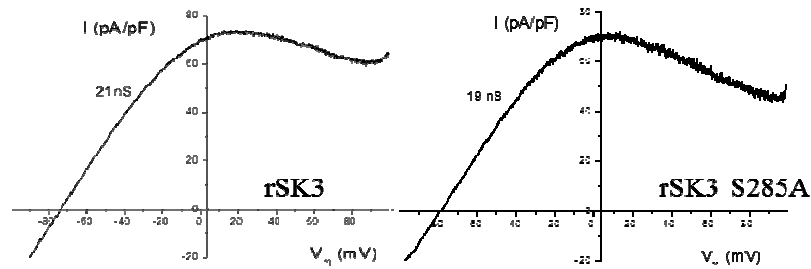


Figure 37 : Exemple de courants SK3 enregistrés sur des cellules HEK rSK3 (à gauche) et HEK rSK3 S285A muté sur la sérine 285 (à droite).

Courants obtenus en patch-clamp en configuration whole-cell de patch rompu avec une pCa 6 (rampe de + 100 à - 100 mV, en 500 ms avec un potentiel de maintien à 0 mV).

Il est également possible de comparer l'amplitude des courants rSK3 et rSK3 S285A à 0 mV, potentiel d'inversion pour le Cl^- , permettant ainsi de s'affranchir des conductances Cl^- . L'amplitude du courant rSK3 est de $52,7 \pm 14,7$ pA/pF (N = 4) et n'est pas différente de celle du courant rSK3 S285A, qui est de $52,5 \pm 11,2$ pA/pF (N = 5) (test de Mann-Whitney $p > 0,05$). Ainsi la mutation de la sérine 285 n'a pas modifié les propriétés électrophysiologiques du canal rSK3.

L'effet inhibiteur du CI-1044 et du CI-1044 + FSK intervient après les 10 premières secondes d'application et un effet additif entre le CI-1044 et CI-1044 + FSK est visible (Figure 38). L'application des deux molécules permet de réduire l'amplitude du courant rSK3 S285A de 25% avec le CI-1044 et de 43% avec l'application additionnée de FSK.

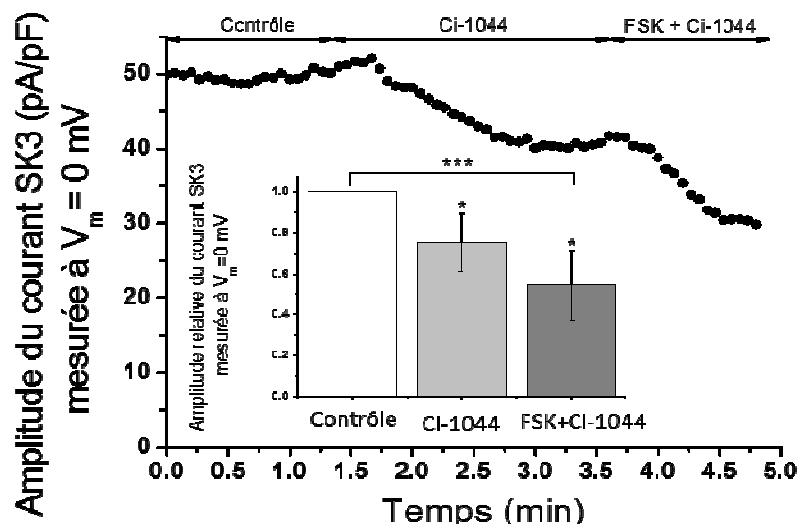


Figure 38 : Effet de FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant rSK3 S285A.

Trace représentative du déroulement cinétique de l'amplitude du courant rSK3 S285A à 0 mV, suite aux traitements par la FSK (10 μM) + CI-1044 (100 μM). Histogrammes montrant les moyennes des amplitudes du courant rSK3 mesurées à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μM) + CI-1044 (100 μM) comparées à la condition contrôle (N = 4 * $p < 0,05$).

La figure 39 montre l'effet de l'application de FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant et sur la conductance membranaire des canaux rSK3 et rSK3 S285A.

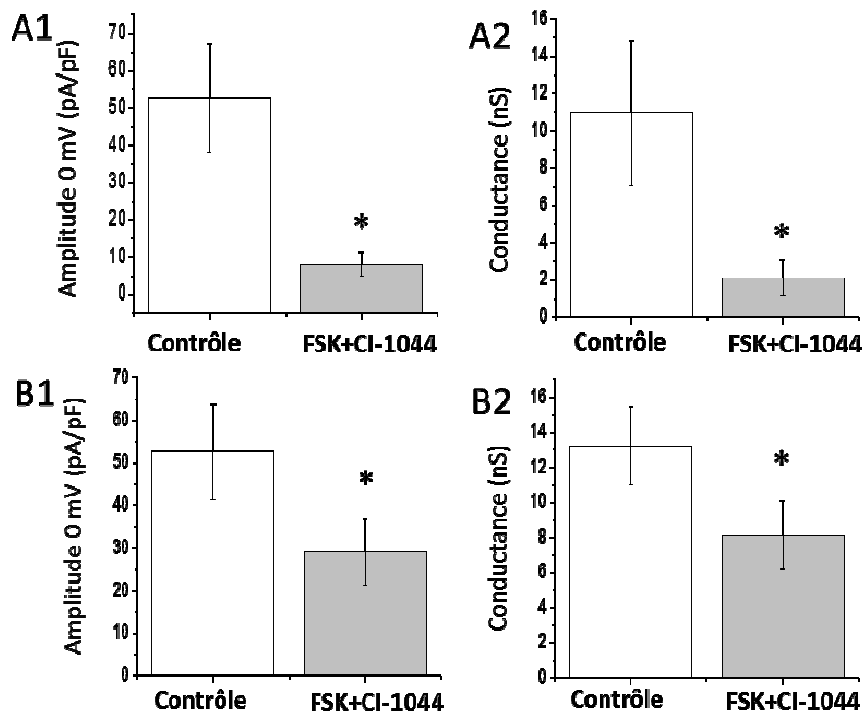


Figure 39 : Effets de FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant rSK3 et rSK3 S285A et sur la conductance membranaire.

A. A1 : Amplitude moyennée du courant rSK3 mesurée à $V_m = 0$ mV en présence ou non de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 4) A2 : Conductances membranaires moyennées des cellules rSK3 avant et après application de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 4). * indique une différence significative $p < 0,05$. B. B1 : Amplitude moyennée du courant rSK3 S285A mesurée à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) comparée à la condition contrôle (N = 4) B2 : Conductances membranaires moyennées des courants rSK3S285A avant et après application de la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 4). * indique une différence significative $p < 0,05$.

L'application de FSK + CI-1044 réduit l'amplitude du courant rSK3 comme observée précédemment au laboratoire (Clarysse *et al.*, 2013). La FSK + CI-1044 réduit également l'amplitude du courant rSK3 S285A, mais cet effet est plus faible comparé à celui observé sur le courant rSK3 (Figure 39). En effet, l'application de FSK + CI-1044 réduit significativement l'amplitude du courant rSK3 de 86% contre 47,7% pour le rSK3 S285A (Mann-Whitney $p < 0,011$).

La sérine 285 semble donc responsable de près de 50% de l'effet inhibiteur de la PKA sur l'activité du canal rSK3.

1.2) Rôle dans la migration cellulaire

Les effets de la FSK + CI-1044 sur la migration des cellules HEK293T rSK3 S285A ont été testés. Des études précédentes ont montré que la FSK + CI-1044 réduisaient de 81,9% la migration dépendante du canal SK3 dans les cellules MDA-MB-435s (Clarysse *et al.*, 2013). La FSK + CI-1044 ont été appliqués à 10 μ M et 100 μ M pendant l'expérience de migration de 24h sur des cellules HEK293T rSK3 et HEK293T rSK3 S285A (Figure 40). L'application FSK + CI-1044 diminue de 30% la migration des cellules HEK293T rSK3, alors que le même traitement n'a pas d'effet significatif sur la migration des cellules HEK293T rSK3 S285A (Figure 40).

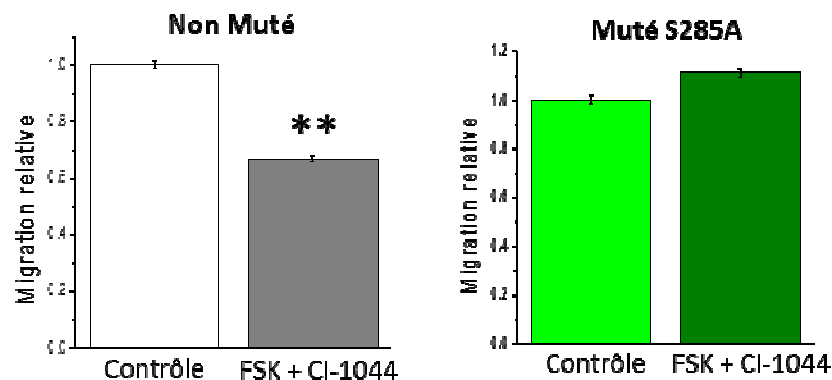


Figure 40 : Effets de la mutation du canal rSK3 et de l'application de FSK + CI-1044 sur la migration des cellules HEK293T rSK3 et HEK293T rSK3 S285A.

Les cellules ont été traitées avec la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) pendant la durée de l'expérience (24h) (N = 3, n = 6, Mann Whitney, ** p< 0,01).

On aurait pu s'attendre à ce qu'il y ait toujours un effet résiduel de la FSK + CI-1044 car cette mutation ne réduit que de 50% l'activité du canal SK3. Il est probable que l'action résiduelle de la FSK + CI-1044 ne puisse pas être observée dans ce modèle car les cellules HEK293T sont des cellules qui migrent peu. Il serait donc nécessaire de refaire ces expériences à l'aide des MDA-MB-435s qui possèdent une forte capacité à migrer.

II). Effet de la FSK + CI-1044 sur le canal hSK3

2.1) Etudes électrophysiologiques

La sérine 285 du rSK3 est retrouvée sur le canal SK3 humain (hSK3) en position 289. Les études de l'activité du canal hSK3 ont été réalisées sur des cellules HEK293T transfectées de façon stable par le canal hSK3 donnant ainsi les cellules HEK293T hSK3. Comme pour le courant rSK3 nous avons caractérisé le courant hSK3 et testé les effets de la FSK + CI-1044 sur : 1) l'amplitude du courant à 0 mV, 2) la conductance membranaire qui représente la capacité de la cellule à laisser passer les ions au travers de la membrane et sur 3) le potentiel d'inversion du courant qui correspond dans nos conditions au potentiel de membrane des cellules. Comme le courant rSK3, le courant hSK3 est un courant sortant qui rectifie dans le sens entrant pour des potentiels de membrane supérieur à 0 mV (Figure 41). La moyenne du potentiel d'inversion est de $-77,2 \pm 1,4$ mV (N = 15), ce qui n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les cellules avec le rSK3 ($-81,9 \pm 1,1$ mV) (N = 4) (Mann-Whitney $p > 0,05$). L'amplitude du courant hSK3 à 0 mV n'est pas différente de celle mesurée pour rSK3 et est égale à $99,6 \pm 14,5$ pA/pF (N = 15) et $52,7 \pm 14,7$ pA/pF (N = 4) respectivement pour hSK3 et rSK3 (Mann-Whitney $p = 0,051$). Par contre la conductance membranaire est différente. Elle est de $20,6 \pm 2,9$ nS pour le hSK3 (N = 15) et de $10,9 \pm 3,9$ nS pour le rSK3 (N = 4) (Mann-Whitney $p < 0,049$). Ces résultats semblent indiquer une activité plus importante du canal hSK3 comparée au canal rSK3.

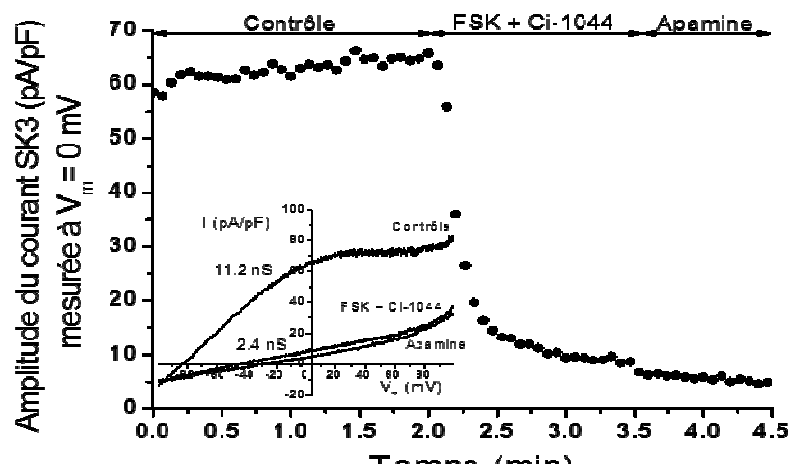


Figure 41 : Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur une cellule HEK293T hSK3.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 en fonction du temps, suite à une application de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M), puis d'apamine (100 nM) pour inhiber le courant hSK3 résiduel ($V_m = 0$ mV). L'application de FSK + CI-1044 déplace le potentiel d'inversion de -82 mV à -44,7 mV et fait varier la conductance membranaire de 11,2 nS à 2,4 nS.

L'application de FSK + CI-1044, diminue significativement le potentiel d'inversion du courant, l'amplitude du courant hSK3 ainsi que la conductance membranaire (Figure 42)

(Tableau 19). Les pourcentages d'inhibition du courant et de la conductance sont de $72,8 \pm 4,2\%$ et de $64,7 \pm 4,0\%$ (Wilcoxon $p < 0,001$; $p < 0,01$) (Figure 41) (Tableau 19).

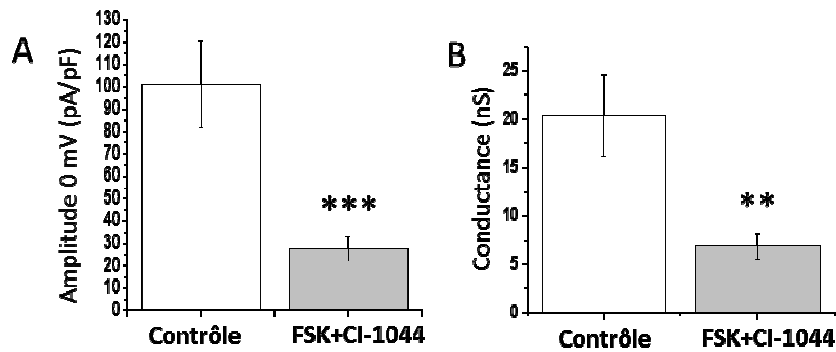


Figure 42 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant hSK3 et sur la conductance membranaire.

A. Amplitude moyennée du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) comparée à la condition contrôle (N = 9) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 9). *** indique une différence significative $p < 0,001$ et ** indique une différence significative $p < 0,01$.

Tableau 19: Récapitulatif des différences des amplitudes de courant, potentiels d'inversion mesurés ainsi que des pourcentages d'inhibition de la FSK + CI-1044 entre les courants des canaux rSK3 et hSK3.

	rSK3		hSK3	
	Contrôle	FSK + CI-1044	Contrôle	FSK + CI-1044
Amplitude du courant (pA/pF)	52,7 ± 14,7	8,1 ± 3,3	99,6 ± 14,5	27,5 ± 5,8
Statistique par rapport au contrôle		***		**
% d'inhibition par rapport au contrôle		86,0 ± 2,2		72,8 ± 4,2
Statistique par rapport au contrôle		***		***
Potentiel d'inversion (mV)	- 81,9 ± 1,1	- 63,0 ± 4,5	- 77,2 ± 1,4	- 58,9 ± 4,6
Statistique par rapport au contrôle		**		**
Conductance membranaire (nS)	10,9 ± 3,9	2,1 ± 0,9	20,6 ± 2,9	6,9 ± 1,4
% d'inhibition par rapport au contrôle		82,0 ± 2,0		64,7 ± 4,0
Statistique par rapport au contrôle		***		**
Nombre de cellules (N)	4	4	15	9

(*** indique une différence significative $P < 0.001$)

(** indique une différence significative $P < 0.01$)

La FSK + CI-1044 ne diminuent pas autant l'amplitude du courant hSK3 que ce qui avait été vu pour le rSK3 et qui était réduit de 90% (Clarysse *et al.*, 2013). Néanmoins, avec 72,8% d'inhibition par la FSK + CI-1044, le canal hSK3 reste suffisamment sensible pour poursuivre les études sur ce canal.

2.2) Développement d'un canal hSK3 avec un motif d'hémagglutinine (HA)

2.2.1 Canal hSK3 avec le motif HA sur la boucle extracellulaire (E3) de la protéine SK3

Nous avons ensuite développé une construction du canal hSK3 avec un motif d'hémagglutinine afin de nous affranchir de problèmes rencontrés lors de techniques utilisant un anticorps anti-SK3, qui s'est révélé peu spécifique, par un anticorps anti-HA. En collaboration avec l'équipe d'Olivier Soriani de l'Université de Nice (CNRS UMR 7277), nous avons développé un vecteur d'expression contenant l'ADNc du hSK3 HA qui a ensuite été introduit de façon stable dans les cellules HEK293T pour créer la lignée HEK293T hSK3 HA. Pour ce faire, plusieurs constructions ont été réalisées avec un placement de ce motif HA à différents endroits du canal hSK3. Ce motif a tout d'abord été introduit sur la boucle extracellulaire entre les segments 3 et 4 de la protéine donnant la construction HEK293T hSK3HA (E2) et aussi sur la boucle entre les segments 5 et 6 amenant à la construction HEK293T hSK3HA (E3) (Figure 43).

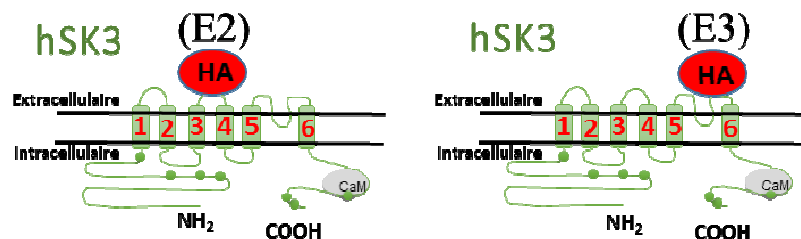


Figure 43 : **Illustrations des constructions du canal hSK3 comportant un motif HA en position extracellulaire.**

Représentation simplifiée des constructions de la protéine hSK3 avec un motif HA sur la boucle E2 (à gauche) ou sur la boucle E3 (à droite). Les ronds en vert, présents sur le schéma, correspondent à l'emplacement des résidus sérines cibles de la PKA. Il y en a 4 sur l'extrémité N-terminale et 3 sur l'extrémité C-terminale.

Concernant la construction du canal hSK3 HA (E2) seul l'ARNm était présent. La protéine n'a pu être identifiée en western-blot. Pour la construction HEK293T hSK3 HA (E3) la protéine hSK3 est bien exprimée. Nous avons alors comparé les propriétés électrophysiologiques du canal hSK3 HA (E3) avec celles du canal hSK3 et testé la sensibilité à la FSK + CI-1044 (Figures 44 et 45) et à l'Ohmline (Figure 46) de cette nouvelle construction.

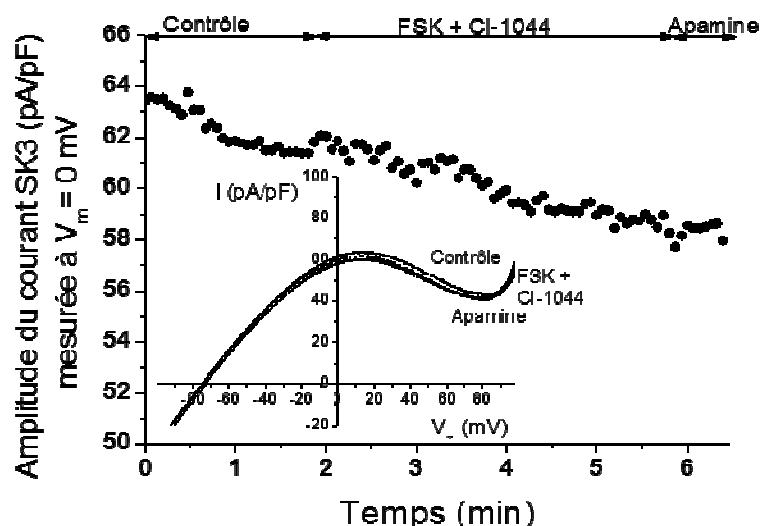


Figure 44: Exemple de l'effet de FSK+ CI-1044 sur le courant SK3 en fonction du temps.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, sur cellule HEK293T hSK3HA (E3) suite au traitement à la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M), puis après application de l'apamine (100 nM). L'apamine a été utilisée pour inhiber le courant hSK3 résiduel.

La figure 44 montre que le courant hSK3 HA (E3) présente une rectification entrante pour les potentiels positifs entre +20 mV et +60 mV. L'amplitude du courant à 0 mV est significativement différente de celle des hSK3 qui est de $64,7 \pm 10,7$ pA ($N = 5$) pour hSK3 HA (E3) et de $99,6 \pm 14,5$ pA ($N = 15$) pour hSK3 (Mann-Whitney $p < 0,01$). Par ailleurs, la conductance membranaire n'est pas significativement différente. Elle est de $12,5 \pm 2,8$ nS ($N = 5$) pour hSK3 HA (E3) et de $20,6 \pm 2,9$ nS pour hSK3 ($N = 15$) (Mann-Whitney $p > 0,05$). Egalement, le potentiel d'inversion n'est pas différent, il est de $-75,7 \pm 3,5$ mV ($N = 5$) pour hSK3 HA (E3) et de $-77,2 \pm 1,4$ mV pour hSK3 ($N = 15$) (Mann-Whitney $p > 0,05$). Par conséquent les propriétés électrophysiologiques semblent conservées avec l'étiquette HA sur la boucle E3 même si cette construction semble délivrer moins de courant que celle hSK3 sans étiquette.

De façon surprenante, l'application de FSK + CI-1044 n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant hSK3 HA (E3) (Mann Whitney $p > 0,05$) (Figure 44 et 45) contrairement à ce qui avait été vu avec le canal hSK3.

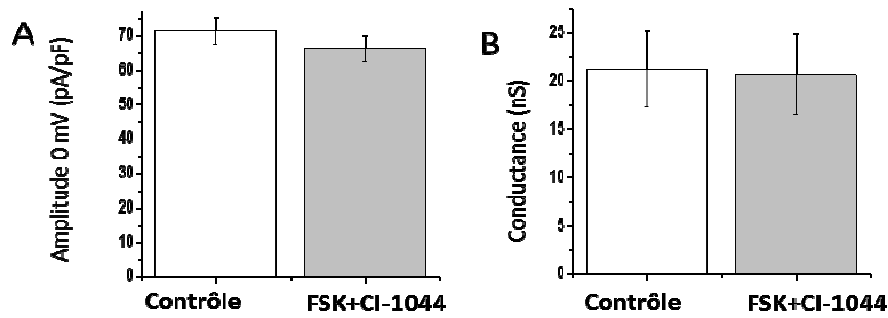


Figure 45 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA (E3).

A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesurés à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 4) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de l'Ohmline à 10 μ M (N = 4).

Par ailleurs, ce courant hSK3 HA (E3) est insensible à 100 nM d'apamine (N = 4, Wilcoxon $p > 0,05$). Le placement de ce motif à proximité du pore du canal doit perturber l'action de cette toxine dans le pore. Ce courant hSK3 HA (E3) est également insensible à l'Ohmline. La figure 46 montre que l'application l'Ohmline n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant hSK3 HA (E3) (Mann Whitney $p > 0,05$) contrairement à ce qui avait été observé pour le canal hSK3.

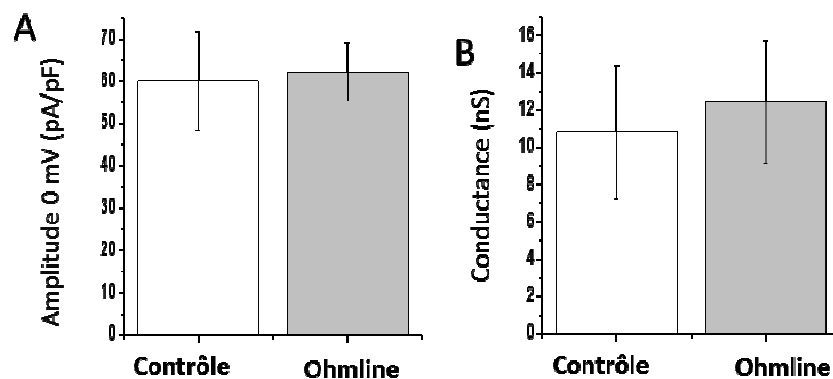


Figure 46 : Effets de l'Ohmline sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA (E3).

A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence d'Ohmline (10 μ M) comparée à la condition contrôle (N = 6) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de l'Ohmline à 10 μ M (N = 5).

Nous avons montré que le canal SK3 était localisé au niveau de nanodomains lipidiques, appelés radeaux lipidiques et que l'Ohmline déplace le canal en dehors de ces nanodomains (Guéguinou *et al.*, 2015). Nous avons donc étudié la localisation de la protéine hSK3 HA (E3) dans les cellules HEK293T traitées ou non avec l'Ohmline (Figure 47).

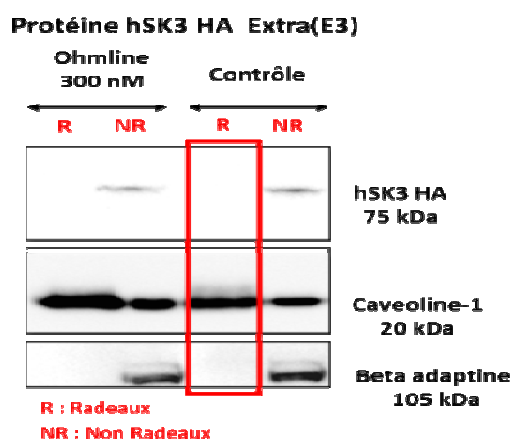


Figure 47 : Localisation membranaire de la protéine hSK3 HA (E3) dans les cellules HEK293T hSK3 HA (E3) traitées ou non avec 300 nM d'Ohmline durant 30 minutes (N = 2).

On remarque que, la protéine hSK3 HA(E3) est retrouvée en dehors des nanodomains lipidiques et que le traitement à l'Ohmline ne modifie pas sa localisation. Ces résultats pourraient expliquer l'absence d'effet de l'Ohmline en patch-clamp sur le courant hSK3 HA (E3). Le courant hSK3 HA (E3) est diminué de façon transitoire par le TEA à 10 mM (Figure 48) alors que son effet est maintenu sur rSK3 (Potier *et al.*, 2006).

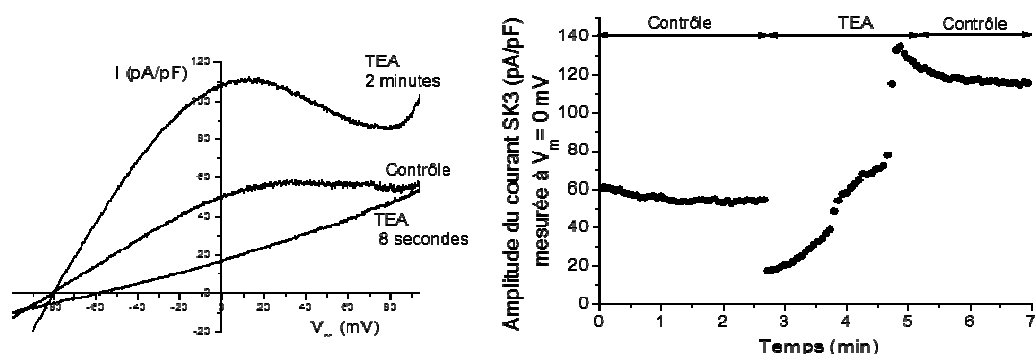


Figure 48 : Exemple de l'effet du TEA sur le courant hSK3 HA (E3).

Trace représentative de l'amplitude du courant hSK3 HA (E3) ($V_m = 0$ mV) suite au traitement au TEA à 10 mM (N = 2).

Cependant, l'application du 4-amino-pyridine (4-AP) à 5 mM a permis de diminuer de façon maintenue les amplitudes des courants hSK3 HA (E3) (Figure 49) comme observés précédemment avec le canal SK3 (Potier *et al.*, 2006).

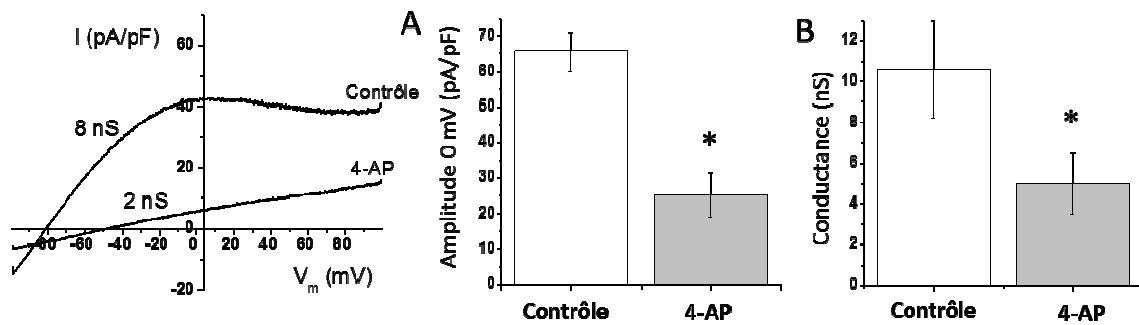


Figure 49 : Exemple de l'effet de la 4-AP sur le courant hSK3 HA (E3).

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite à l'application de 4-AP à 5 mM et d'apamine (100 nM). A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de 4-AP (5 mM) comparée à la condition contrôle (N = 4) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application au 4-AP (N = 4). * indique une différence significative $p < 0,05$).

La 4-AP a significativement modifié le potentiel d'inversion du courant (de $-75,7 \pm 23,5$ mV en condition contrôle, à $-51,3 \pm 1,2$ mV avec le 4-AP (N = 4)) (test de Mann-Whitney $p < 0,05$). Les pourcentages d'inhibition de la 4-AP sur le courant et la conductance sont de 61,7% (Figure 49 Droite A) et de 54,5% (Figure 49 Droite B) (N = 4 ; test de Wilcoxon $p = 0,05$).

2.2.2 Canal hSK3 avec un motif HA en position N-terminale

Comme le motif HA positionné sur la boucle entre les segments 5 et 6 a conduit à un canal SK3 insensible à la FSK + CI-1044 ainsi qu'à l'apamine et à l'Ohmline, nous avons développé une autre construction en insérant le motif HA sur l'extrémité N-terminale. Contrairement à la protéine hSK3 HA (E3), la protéine hSK3 HA N-terminale est bien présente dans les fractions membranaires enrichies en nanodomains (Figure 50).

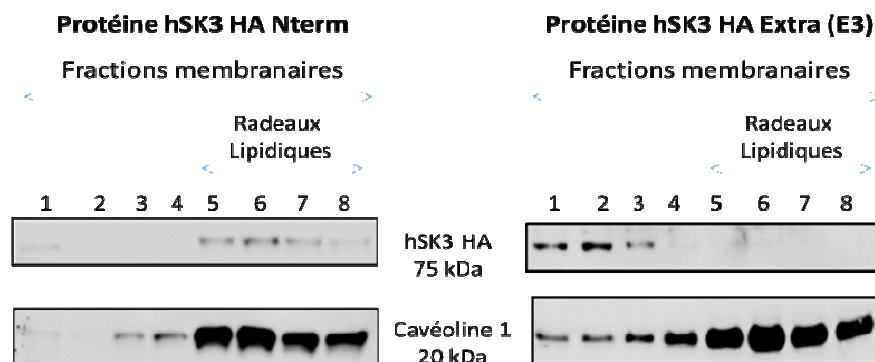


Figure 50 : Comparaison de la localisation membranaire des canaux hSK3 HA N-terminale et hSK3 HA E3 dans les cellules HEK293T. (N = 2).

Fort de ce premier résultat, nous avons ensuite testé l'effet de l'Ohmline sur la localisation de cette protéine dans les radeaux lipidiques (Figure 51). Un traitement des cellules avec 300 nM d'Ohmline a délocalisé la protéine hSK3 HA N-terminale en dehors des radeaux lipidiques.

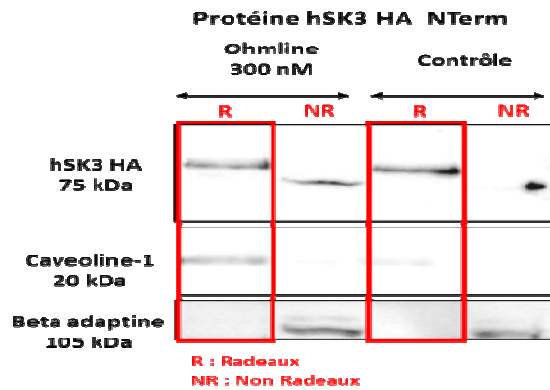


Figure 51 : Localisation membranaire du canal hSK3 HA N-terminale dans les cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale.

Localisation de SK3 et comparaison de cette localisation avec un prétraitement à l'Ohmline de 300 nM pendant 30 minutes (N = 2).

Le laboratoire a montré que le canal SK3 était situé dans des nanodomains riches en cholestérol (Chantôme *et al.*, 2013). Nous avons alors étudié l'effet de la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), un agent connu pour réduire le cholestérol membranaire, sur l'activité du canal hSK3 HA N-terminale (Figure 52).

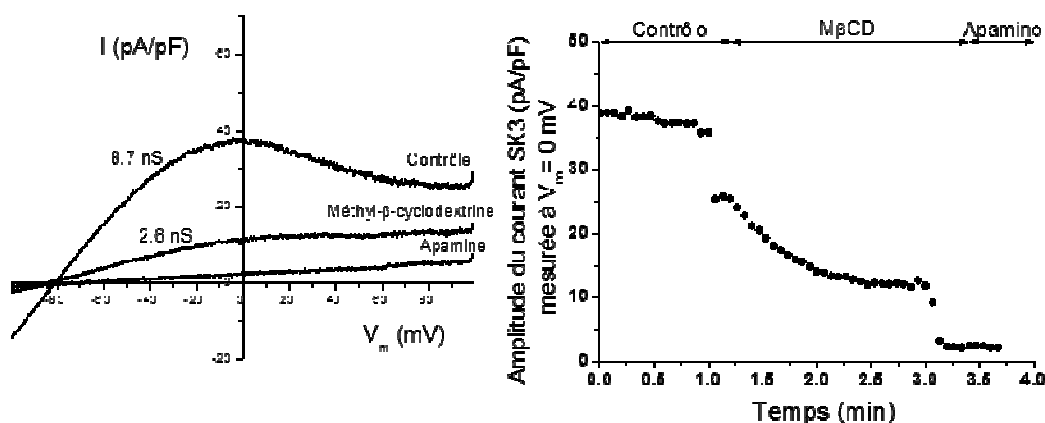


Figure 52 : Exemple de l'effet de la méthyl- β -cyclodextrine sur le courant hSK3 HA N-terminale.

Traces représentatives de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite au traitement de M β CD (15 mM) puis à l'application de l'apamine (100 nM). L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 résiduel. L'application de M β CD ne déplace pas le potentiel d'inversion, restant de -80 mV, mais diminue la conductance membranaire de 8,7 nS à 2,6 nS.

La figure 52 montre que la M β CD réduit l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale de $46,5 \pm 7,4$ pA/pF à $28,4 \pm 8,5$ pA (N = 5 ; test de Wilcoxon p = 0,01). L'état stable est atteint 90 secondes après application de la M β CD. La conductance membranaire est également diminuée par la M β CD à $8,4$ nS \pm 2,2 nS (N = 5, Wilcoxon p = 0,019). Le pourcentage d'effet inhibiteur de la M β CD sur l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale est de $44,1\% \pm 9,7$ et est de $41,4\% \pm 10,4$ sur la conductance membranaire (Figure 53).

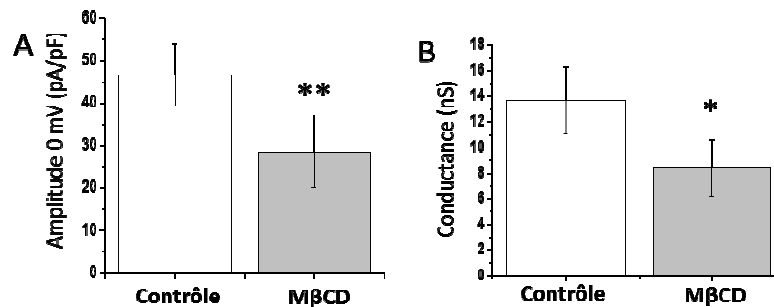


Figure 53 : Effets de la méthyl- β -cyclodextrine sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire de cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale.

A. Amplitude moyennée du courant SK3 mesurée à $V_m = 0$ mV en présence de M β CD (15 mM) comparée à la condition contrôle (N = 5). B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de la M β CD (15 mM) (N = 5). ** indique une différence significative p < 0,01 et * indique une différence significative p < 0,05.

Nous avons par la suite étudié les propriétés électrophysiologiques du canal hSK3 HA N-terminale et nous avons testé les effets de la FSK + CI-1044.

2.2.3 Effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale

L'activité de la protéine hSK3 HA N-terminale a été étudiée en patch-clamp et comparée à celle du hSK3. Le courant hSK3 HA N-terminale est un courant sortant, rectifiant dans le sens entrant pour des potentiels de membrane supérieur à 0 mV (Figure 54). Ces caractéristiques sont identiques à qui avait été observé avec le canal hSK3. Le potentiel d'inversion est de $-78,6 \pm 1,9$ mV pour le hSK3 HA N-terminale (N = 21) et n'est pas différent de celui pour le hSK3 qui est de $-77,2 \pm 1,4$ mV (N = 15) (Mann Whitney p > 0,05) (Tableau 19). Néanmoins, l'amplitude du courant à 0 mV est modifiée et est de $63,8 \pm 10,1$ pA/pF pour le hSK3 HA N-terminale (N = 21) et de $99,6 \pm 14,5$ pA/pF pour le hSK3 (N = 15) (Mann Whitney p < 0,001). Egalement, la conductance membranaire est différente et est de $14,3 \pm 2,8$ nS pour hSK3 HA N-terminale (N = 21) et $20,6 \pm 2,9$ pour hSK3 (N = 15) (Mann Whitney p = 0,006). Ces résultats montrent que le canal hSK3 HA N-terminale génère moins de courant SK3 que le hSK3. La position du motif sur l'extrémité N-terminale n'a pas modifié les caractéristiques électrophysiologiques des courants mais il est possible que cela perturbe

l'adressage à la membrane des canaux et expliquerait cette différence d'amplitude de courant mesurée.

L'effet de la FSK + CI-1044 a été testé sur les courants hSK3 HA N-terminale (Figures 54 et 55) et comparé à l'effet sur le courant hSK3.

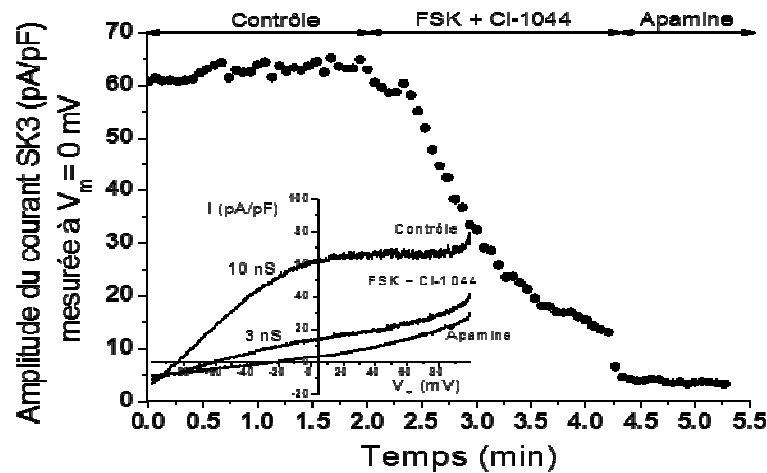


Figure 54 : Exemple de l'effet de FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite au traitement à la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M), puis à l'application de l'apamine (100 nM). L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 résiduel. L'application de FSK + CI-1044 déplace le potentiel de membrane allant de -82 mV à -60 mV associé à une diminution de la conductance membranaire de 10 nS à 3 nS.

L'application de FSK + CI-1044 induit une diminution significative de l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale ainsi que de la conductance membranaire et du potentiel d'inversion (Tableau 19). Les pourcentages d'inhibition pour le courant et la conductance sont de $77,1\% \pm 3,7$ et de $63,7\% \pm 2,6$ ($N = 11$) (Tableau 20). Ces pourcentages d'inhibition ne sont pas significativement différents de ceux mesurés pour le courant hSK3 (Kruskall-Wallis $p > 0,05$).

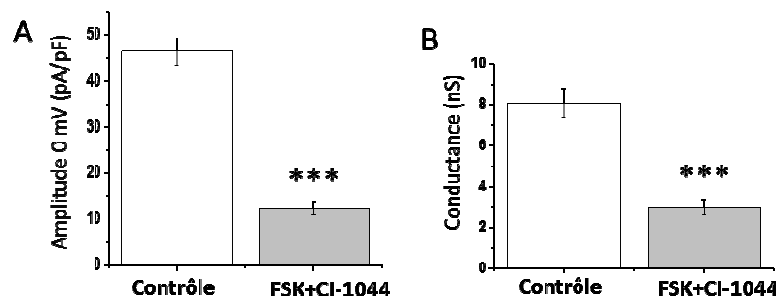


Figure 55 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 de cellules HEK293 hSK3 HA N-terminale et sur la conductance membranaire.

A. Amplitudes moyennées du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) comparées à la condition contrôle ($N = 11$) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) ($N = 11$). *** indique une différence significative $p < 0,001$.

III). Rôle des résidus sérine de la partie N-terminale de hSK3 dans la sensibilité à la FSK + CI-1044

3.1) Etudes électrophysiologiques du canal hSK3 HA muté S289A

La mutation de la sérine en position 289 du canal hSK3 HA N-terminale a été réalisée et nous avons caractérisé le courant et les effets de l'application de la FSK + CI-1044 sur ce courant (Figure 56). Le but a été de vérifier si la sérine 289 du canal hSK3 HA N-terminale était responsable de la moitié des effets de la PKA comme montré pour le canal rSK3 et la sérine 285.

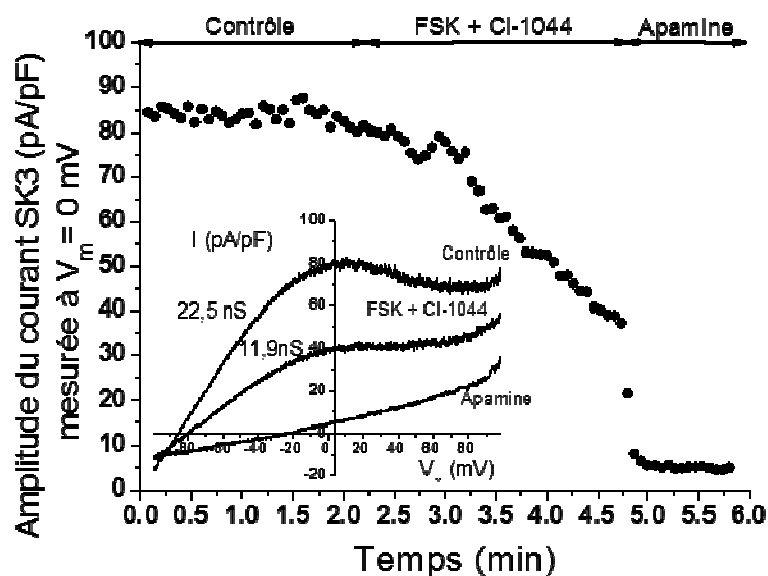


Figure 56 : Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A. Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite au traitement à la FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M), suivi de l'application de l'apamine (100 nM). L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 résiduel. La conductance membranaire varie avec l'effet de FSK + CI-1044 de 22,5 nS à 11,9 nS.

Comme ce qui avait été vu précédemment pour le canal de rat muté, le courant est sortant et rectifie dans le sens entrant pour des potentiels de membrane supérieurs à 0 mV (Figure 56). La mutation de la sérine 289 du hSK3 HA N-terminale n'a pas modifié les valeurs de potentiel d'inversion du courant qui est de $-79,7 \pm 1,4$ mV ($N = 10$) pour le hSK3 HA N-terminale S289A et de $-78,6 \pm 1,9$ mV ($N = 21$) pour le hSK3 HA N-terminale (Mann-Whitney $p > 0,05$). L'amplitude, par contre, du courant à 0 mV est plus grande comparée à celle hSK3 HA N-terminale. En effet, l'amplitude du courant est de $63,8 \pm 10,1$ pA/pF pour le hSK3 HA N-terminale et de $122,4 \pm 13,8$ pA/pF pour le hSK3 HA N-terminale S289A (Mann-Whitney $p < 0,001$). De façon identique, la conductance membranaire est plus importante

pour le hSK3 HA N-terminale S289A ($26,9 \pm 2,8$ nS) que pour le hSK3 HA N-terminale ($14,3 \pm 2,8$ nS) (Mann Whitney $p < 0,001$). Cependant, si on compare les propriétés électrophysiologiques des courants hSK3 (N = 15) et hSK3 HA N-terminale S289A (N = 10) il n'y a pas de différence significative d'amplitude du courant à 0 mV ni de conductance (Mann-Whitney $p > 0,05$).

La figure 56 montre un exemple des effets de FSK + CI-1044 sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A avec une diminution de l'amplitude qui dépend du temps et un état stable qui est atteint au bout de 3 minutes après application de FSK + CI-1044. Bien que l'application de FSK + CI-1044 n'a pas eu d'effet significatif sur le potentiel d'inversion du courant elle a réduit l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale S289A ainsi que la conductance membranaire (Figure 57) (Tableau 20).

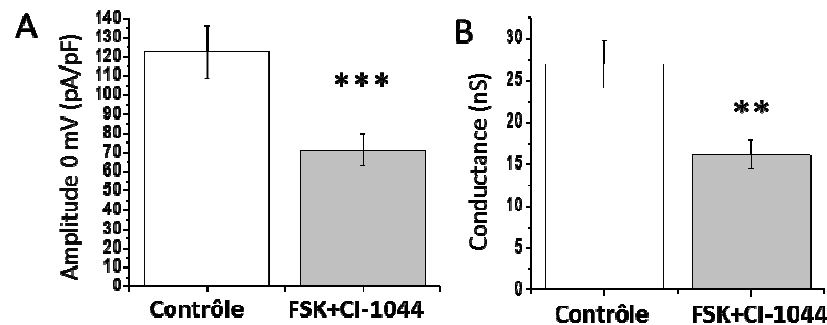


Figure 57 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et sur la conductance membranaire de cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A.

A. Amplitude moyennée du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de FSK ($10 \mu\text{M}$) + CI-1044 ($100 \mu\text{M}$) (N = 10). B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de la FSK ($10 \mu\text{M}$) + CI-1044 ($100 \mu\text{M}$) (N = 10). *** indique une différence significative $p < 0,001$ et ** indique une différence significative $p < 0,01$.

La FSK + CI-1044 a réduit de $46\% \pm 7,6$ (N = 10) l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale S289A ce qui est significativement plus faible que l'effet observé sur le courant hSK3 HA N-terminale ($77,1\% \pm 2,8$) (N = 11, Mann Whitney $p < 0,001$). De façon similaire l'effet sur la conductance est réduit de $40,0\% \pm 2,8$ pour le canal hSK3 HA N-terminale S289A et de $63,7\% \pm 2,6$ pour le canal hSK3 HA N-terminale (Mann-Whitney $p < 0,001$).

De façon intéressante nous retrouvons un pourcentage d'inhibition par la FSK + CI-1044 identique entre les courants rSK3 mutés au niveau de cette sérine 285 ($47,7\% \pm 10,2$, N = 4) et les canaux hSK3 HA N-terminale mutés au niveau de cette sérine 289 ($46\% \pm 7,6$; N = 10) (Test de Mann-Whitney $p > 0,05$).

3.2) Etudes électrophysiologiques du canal hSK3 HA N-terminale muté S289A-S197A-S172A-S133A

La protéine hSK3 comprend 7 résidus sérines dont 4 localisés sur l'extrémité N-terminale, respectivement Ser133, Ser172, Ser197 et Ser289 (Figure 58). Afin de tester le rôle des autres sérines, nous avons muté les 3 autres sérines présentes sur cette extrémité N-terminale de la protéine hSK3 en plus de la sérine 289 afin d'obtenir le canal hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.

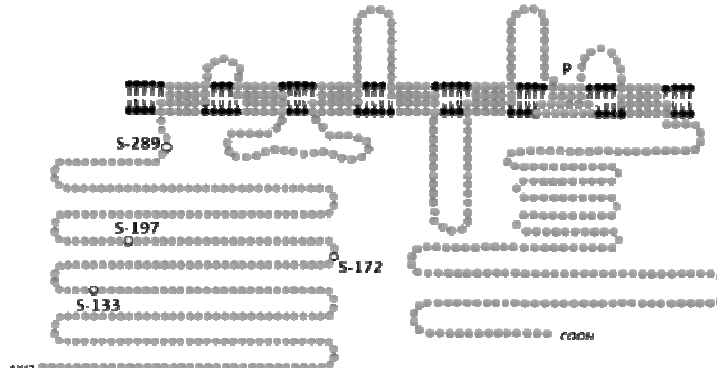


Figure 58 : Représentation schématique de la localisation des résidus sérines présents sur la partie N-terminale de la protéine hSK3.

Quatre résidus sérines sont localisés en Ser289, Ser197, Ser172 et Ser133 sur la partie N-terminale.

Le courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A présente une rectification entrante pour les potentiels positifs de +20 mV à +60 mV, comme observée avec les canaux hSK3 HA N-terminale et hSK3 HA N-terminale S289A (Figure 59).

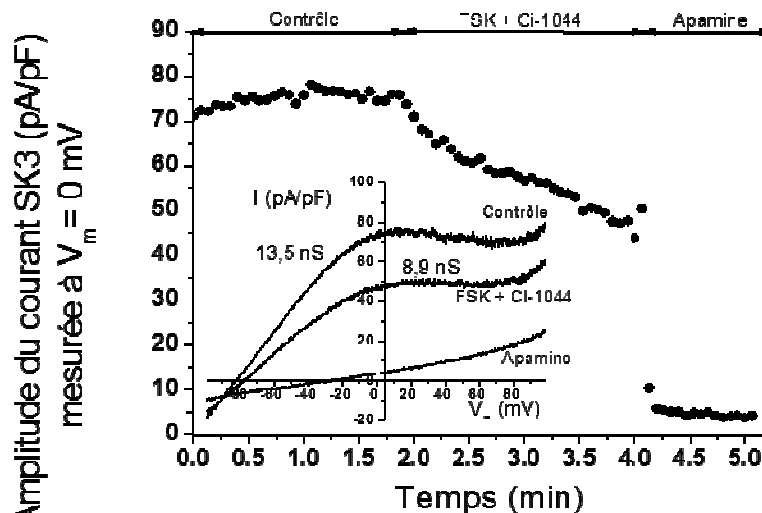


Figure 59 : Exemple de l'effet de la FSK + CI-1044 sur le courant hSK3HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite à l'application de FSK (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M), puis à l'application de l'apamine (100 nM). L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 résiduel. La conductance membranaire varie avec l'effet de FSK + CI-1044 de 13,5 nS à 8,9 nS.

Les mutations des 4 sérines n'ont pas modifié les valeurs de potentiel d'inversion du courant qui est de $-81,1 \pm 1,9$ mV (N = 22) pour le hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A et de $-78,6 \pm 1,9$ mV (N = 21) pour le hSK3 HA N-terminale (Mann-Whitney $p > 0,05$). La conductance membranaire n'est pas modifiée et est de $16,3 \pm 1,3$ nS pour hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A (N = 22) contre $14,3 \pm 2,8$ pour le canal hSK3 HA N-terminale (N = 21) (Mann-Whitney $p > 0,05$). L'amplitude du courant à 0 mV est par contre différente et est de $63,8 \pm 10,1$ pA/pF pour le hSK3 HA N-terminale (N = 21) et de $77,8 \pm 8,3$ pA/pF pour le hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A (N = 22) (Mann-Whitney $p = 0,017$). Par ailleurs, l'amplitude du courant est plus faible ($77,8 \pm 8,3$ pA/pF (N = 22)), que celle du courant hSK3 HA N-terminale S289A ($122,4 \pm 13,8$ pA (N = 10)) (Mann-Whitney $p < 0,008$). La conductance est également plus faible et est de $16,3 \pm 1$, (N = 22) et de $26,9 \pm 2,8$ (N = 10) pour les canaux hSK3 HA N-terminale S289A (Mann-Whitney $p < 0,001$). A l'inverse la moyenne du potentiel d'inversion de $-81,1 \pm 1,9$ mV (N = 22) est similaire à celle du canal hSK3 HA N-terminale S289A ($-79,7 \pm 1,4$ mV) (N = 10, Mann-Whitney $p > 0,05$). Ces résultats semblent indiquer que si la mutation de la sérine 289 a augmenté l'activité des canaux hSK3 les mutations des 4 sérines ont diminué l'activité des canaux hSK3 qui se retrouve avec une activité identique aux canaux hSK3. Le tableau 20 et la figure 60 montrent que la FSK + CI-1044 ne modifie pas le potentiel d'inversion du couranthSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A mais diminue son amplitude et sa conductance membranaire. Par ailleurs, les quatre mutations réduisent l'effet de la FSK + CI-1044 par rapport à la mutation unique avec une moyenne d'effet de $46\% \pm 7,6$ (N = 10) pour le canal hSK3 HA N-terminale S289A et de $33,6\% \pm 10,5$ pour le canal hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A (N = 12) (Mann-Whitney $p < 0,01$).

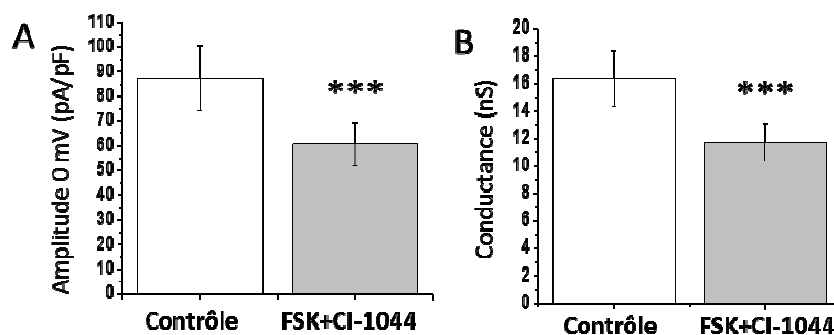


Figure 60 : Effets de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.

A. Amplitude moyennée du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de FSK (10 μ M) et de CI-1044 (100 μ M) dans les cellules comparées à la condition contrôle (N = 12). B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de (10 μ M) + CI-1044 (100 μ M) (N = 12). *** indique une différence significative $p < 0,001$.

Ces résultats indiquent que l'effet de la FSK + CI-1044 est dépendant des quatre sérines de l'extrémité N-terminale du canal SK3.

Tableau 20 : Récapitulatif des différences des amplitudes de courant, potentiels d'inversion mesurés ainsi que des pourcentages d'inhibition de la FSK + CI-1044 pour les différentes constructions du canal hSK3 avec ou sans motif HA en N-terminale.

	hSK3		hSK3 HA N-terminale		hSK3 HA S289A N-terminale		hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A	
	Contrôle	FSK + CI-1044	Contrôle	FSK + CI-1044	Contrôle	FSK + CI-1044	Contrôle	FSK + CI-1044
Amplitude du courant (pA/pF)	99,6 ± 14,5	27,5 ± 5,8	63,8 ± 10,1	12,3 ± 1,4	122,4 ± 13,8	71,1 ± 8,7	77,8 ± 8,3	60,5 ± 8,6
Statistique par rapport au contrôle		**		***		***		**
% d'inhibition par rapport au contrôle		72,8 ± 4,2		77,1 ± 3,7		46 ± 7,6		33,6 ± 10,5
Statistique par rapport au contrôle		***		***		***		***
Potentiel d'inversion (mV)	- 77,2 ± 1,4	- 58,9 ± 4,6	- 78,6 ± 1,9	- 57,7 ± 4,2	- 79,7 ± 1,4	- 76,6 ± 1,6	- 81,1 ± 1,9	- 78,5 ± 1,7
Statistique par rapport au contrôle		**		**		NS		NS
Conductance membranaire (nS)	20,6 ± 2,9	6,9 ± 1,4	14,3 ± 2,8	3,0 ± 0,4	26,9 ± 2,8	16,2 ± 1,7	16,3 ± 1,3	11,7 ± 1,4
% d'inhibition par rapport au contrôle		64,7 ± 4,0		63,7 ± 2,6		40,0 ± 2,8		27,7 ± 2,6
Statistique par rapport au contrôle		**		***		**		***
Nombre de cellules (N)	15	9	21	11	10	10	22	12

(*** indique une différence significative P < 0.001)

(** indique une différence significative P < 0.01)

(NS n'indique pas de différence significative P > 0.05)

IV). Effet de l'Ohmline sur l'activité des canaux hSK3

4.1) Le canal hSK3

Les effets de l'Ohmline ont été testés sur l'activité du canal hSK3. La cinétique de l'inhibition du canal hSK3 a été réalisée et a montré que l'état stable était atteint 3 minutes après application de 10 μ M d'Ohmline (Figure 61).

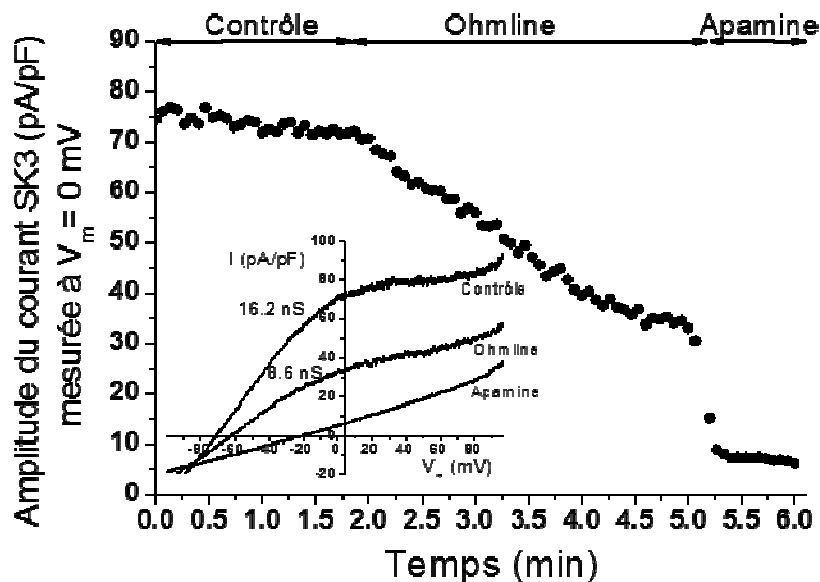


Figure 61 : Exemple de l'effet de l'Ohmline sur cellule HEK293T hSK3.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite à l'application de l'Ohmline (10 μ M), puis après application de l'apamine. L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber l'activité du canal hSK3 résiduel. L'application d'Ohmline déplace le potentiel d'inversion de -71 mV vers -63 mV associés à une diminution de la conductance membranaire de 16,2 nS à 8,6 nS.

Si l'Ohmline n'a pas significativement modifié le potentiel d'inversion du courant, en revanche, la conductance membranaire est significativement diminuée ainsi que les amplitudes des courants (Tableau 21). Les pourcentages d'inhibition de l'amplitude du courant et de la conductance sont respectivement de $50,7\% \pm 3,3$ et de $45,6\% \pm 2,4$ ($N = 6$; test de Wilcoxon $p = 0,004$) (Figure 62) (Tableau 21).

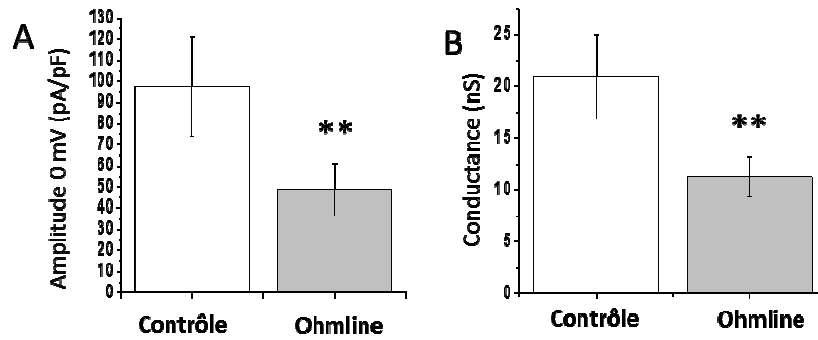


Figure 62 : Effets de l'Ohmlin sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3.

A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence d'Ohmlin (10 μ M) comparée à la condition contrôle (N = 6) B. Conductance membranaire de la cellule avant et après application de l'Ohmlin à 10 μ M (N = 6). ** indique une différence significative $p < 0,01$.

L'Ohmlin ne diminue pas autant l'amplitude du courant hSK3 que ce qui avait été vu pour le rSK3 qui était réduit de 70% (Berthe *et al.*, 2016). Néanmoins, avec 50,7% d'inhibition par l'Ohmlin, nous avons continué à étudier les effets de l'Ohmlin sur ce canal.

4.2) Le canal hSK3 HA N-terminale

Les effets de l'Ohmlin ont également été testés sur l'activité du canal hSK3 HA N-terminale. La cinétique de l'inhibition du canal hSK3 HA N-terminale par l'Ohmlin a été réalisée et a montré que l'état stable est atteint 3 minutes après application de 10 μ M d'Ohmlin (Figure 63). L'Ohmlin n'a pas modifié le potentiel d'inversion du courant mais a réduit la conductance membranaire de l'amplitude du courant à 0 mV (Tableau 21).

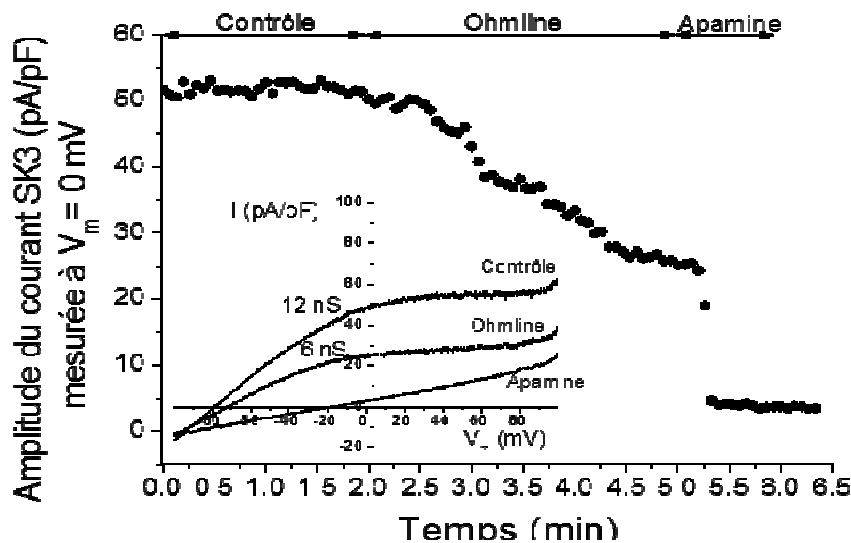


Figure 63: Exemple de l'effet de l'Ohmlin sur cellule HEK293T hSK3 HA N-terminale.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite au traitement à l'Ohmlin (10 μ M), puis à l'application de l'apamine. L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 HA N-terminale résiduel.

Ces résultats ne sont pas différents de ceux qui avait été observés sur le canal hSK3 en présence d'Ohmlin (test de Mann-Whitney $p > 0,05$).

Les pourcentages d'inhibition de l'amplitude du courant à 0 mV et de la conductance ne sont pas différents de ceux obtenus pour le canal hSK3. En effet, l'Ohmlin réduit de $54,5\% \pm 13,0$ et de $50,7\% \pm 3,3$ l'amplitude des courants hSK3 HA N-terminale (N = 10) et hSK3 (N = 6) (Mann Whitney $p > 0,05$) et de $47,3\% \pm 4,4$ et $45,6\% \pm 2,4$ la conductance hSK3 HA N-terminale (N = 10) et hSK3 (N = 6) (Mann Whitney $p > 0,05$) (Figure 64) (Tableau 21).

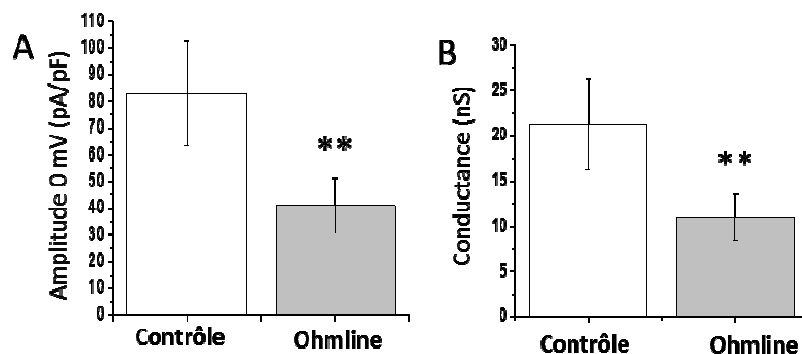


Figure 64 : Effets de l'Ohmlin sur l'amplitude du courant SK3 N-terminale et de la conductance membranaire.

A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesurée à $V_m = 0$ mV en présence d'Ohmlin ($10 \mu\text{M}$) comparée à la condition contrôle (N = 10) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de l'Ohmlin à $10 \mu\text{M}$ (N = 10) (** indique une différence significative $p < 0,01$).

4.3) Le canal hSK3 HA N-terminale S289-S197-S172-S133A

Nous avons par la suite testé l'effet de l'Ohmlin sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A et comparé aux effets obtenus sur le courant hSK3 HA N-terminale afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'Ohmlin agit en favorisant la phosphorylation des résidus sérine par la PKA. Un exemple de trace du courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A avec et sans application de l'Ohmlin est montré en figure 65. La cinétique de diminution de l'amplitude du courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A montre que l'état stable est atteint à 3 minutes après application de l'Ohmlin tout comme pour les courants hSK3 et hSK3 HA N-terminale.

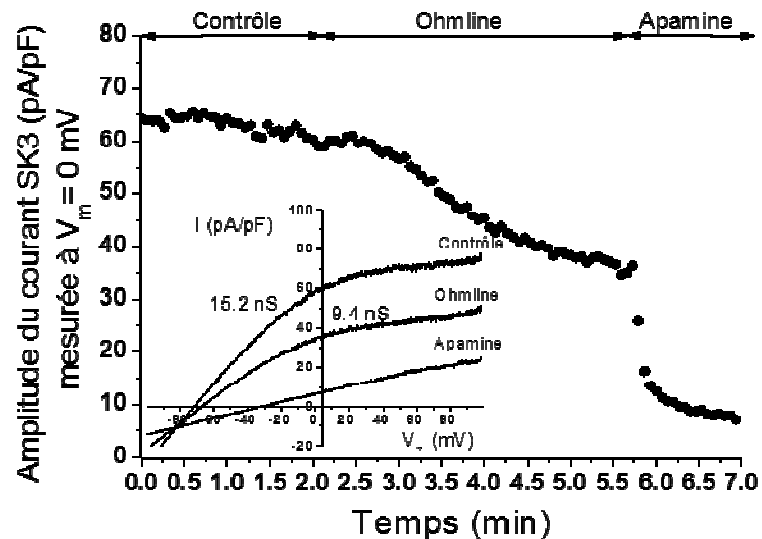


Figure 65: Exemple de l'effet de l'Ohmline sur le courant hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.

Trace représentative de la décroissance de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite au traitement à l'Ohmline (10 μ M), puis à l'application de l'apamine. L'apamine a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant hSK3 résiduel. A l'application de l'Ohmline, le potentiel d'inversion varie de -71 mV vers -67 mV, avec une diminution de la conductance membranaire de 15,2 nS à 9,4 nS.

L'Ohmline a diminué significativement le potentiel d'inversion du courant et a réduit la conductance membranaire et l'amplitude du courant à 0 mV (Tableau 21). Il n'y a pas de différence de potentiel d'inversion après l'application de l'Ohmline entre les courants hSK3, hSK3 HA N-terminale et hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A (Kruskall-Wallis $p > 0,05$) (Tableau 20). Les valeurs de conductance et d'amplitude de courant ne sont également pas différentes de celles obtenues avec l'Ohmline sur les canaux hSK3 et hSK3 HA N-terminale (Kruskall-Wallis $p > 0,05$) (Tableau 21).

La moyenne de l'inhibition de l'activité du canal hSK3 HA N-terminale muté S289A-S197A-S172A-S133A est de $48,6\% \pm 6,7$ ($N = 10$, Wilcoxon $p = 0,001$) et de la conductance est de $40,0\% \pm 4,8$ ($N = 10$, Wilcoxon $p = 0,001$) (Figure 66) (Tableau 21), ce qui n'est pas significativement différent de ce qui avait observé comme effets sur l'activité du canal hSK3 HA N-terminale ($54,5\% \pm 13,0$ et $47,3\% \pm 4,4$ ($N = 10$)) et pour le canal hSK3 ($50,7\% \pm 3,3$ et $45,6\% \pm 2,4$ ($N = 6$)) (Kruskall-Wallis $p > 0,05$).

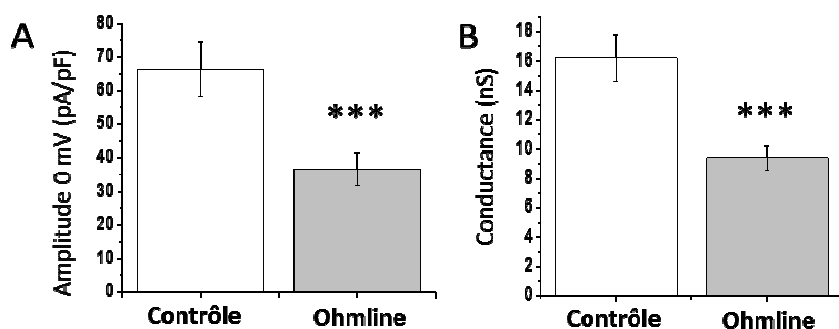


Figure 66: Effets de l'Ohmlin sur l'amplitude du courant SK3 et de la conductance membranaire sur cellules HEK293T hSK3 HA N-terminale S289A-S197A-S172A-S133A.

A. Amplitude moyennée du courant hSK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence d'Ohmlin (10 μ M) comparée à la condition contrôle (N = 10) B. Conductances membranaires moyennées avant et après application de l'Ohmlin à 10 μ M (N = 10). *** indique une différence significative $p < 0,001$.

Ainsi, ni l'étiquette HA ni les mutations des 4 sérines n'ont modifié la capacité de l'Ohmlin à réduire le courant hSK3.

Tableau 21 : Récapitulatif des amplitudes de courant, potentiels d'inversion et des pourcentages d'inhibition du courant SK3 par l'Ohmlin pour les différentes constructions du canal hSK3 avec ou sans motif HA en N-terminale.

	hSK3		hSK3 HA N-terminale		hSK3 HA N-terminale S289A S197A-S172A-S133A	
	Contrôle	Ohmlin	Contrôle	Ohmlin	Contrôle	Ohmlin
Amplitude du courant (pA/pF)	99,6 ± 14,5	48,8 ± 12,3	63,8 ± 10,1	40,0 ± 10,5	77,8 ± 8,3	36,5 ± 5,0
Statistique par rapport au contrôle		**		**		**
% d'inhibition par rapport au contrôle		50,7 ± 3,3		54,5 ± 13,0		48,6 ± 6,7
Statistique par rapport au contrôle		**		**		***
Potentiel d'inversion (mV)	- 77,2 ± 1,4	- 68,8 ± 3,6	- 78,6 ± 1,9	- 72,4 ± 8,5	- 81,1 ± 1,9	- 70,4 ± 4,0
Statistique par rapport au contrôle		NS		NS		*
Conductance membranaire (nS)	20,6 ± 2,9	11,3 ± 2,0	14,3 ± 2,8	8,2 ± 2,6	16,3 ± 1,3	9,4 ± 0,9
% d'inhibition par rapport au contrôle		45,6 ± 2,4		47,3 ± 4,4		40,0 ± 4,8
Statistique par rapport au contrôle		**		**		***
Nombre de cellules (N)	15	6	21	10	22	10

(*** indique une différence significative $P < 0,001$)

(** indique une différence significative $P < 0,01$)

(NS n'indique pas de différence significative $P > 0,05$)

Discussion et perspectives partie II

Nous avons montré que la substitution de la sérine 285 de la protéine SK3 de rat n'a pas modifié les propriétés électrophysiologiques du canal SK3. Ainsi, les amplitudes du courant à 0 mV, le potentiel d'inversion du courant, la rectification entrante et la conductance ne sont pas modifiés par la mutation de la sérine 285. L'application de FSK + CI-1044 a induit une diminution de l'amplitude du courant rSK3 muté de 43%, ce qui correspond à une réduction de moitié par rapport à l'effet vu précédemment sur le canal rSK3 qui était de 90% (Clarysse *et al.*, 2013). Ainsi, la sérine 285 située en position N-terminale du canal est une cible importante de la PKA et expliquerait pourquoi la stimulation de la voie AMPc-PKA par la FSK + CI-1044 réduit également les activités des canaux SK1 et SK2 pour lesquels cette sérine a été retrouvée (Clarysse *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'application de FSK + CI-1044 a diminué de 33% la migration des cellules exprimant le rSK3 non muté probablement par action de la PKA sur les canaux SK3. A l'opposé, la capacité à migrer des cellules exprimant le canal SK3 de rat muté n'a pas été diminuée par la FSK + CI-1044 voire avait tendance à augmenter. Il avait été observé au sein du laboratoire, qu'en présence de l'inhibiteur de la PKA, KT5720, la FSK + CI-1044 augmentaient l'amplitude des courants rSK3 (Clarysse *et al.*, 2013). Il est probable que l'augmentation de la migration observée sur les cellules exprimant le rSK3 muté lors de la stimulation de la voie AMPc-PKA, soit due à un effet de la PKA sur le canal rSK3 indépendamment de la phosphorylation des sérines 285 ou bien soit due à un effet sur d'autres cibles de la voie AMPc ou PKA intervenant dans la migration cellulaire. Par conséquent, ces expériences montrent que l'application de FSK + CI-1044 réduit l'activité du canal rSK3 et de la migration des cellules probablement en phosphorylant la sérine 285 du rSK3.

Nous avons ensuite testé les effets de la stimulation de la voie AMPc-PKA sur le SK3 humain et étudié si la sérine 289 était aussi importante que ce que nous avons observé avec la sérine 285 sur le rSK3. Après avoir démontré que la FSK + CI-1044 et l'Ohmlin réduisaient bien l'activité du canal hSK3 nous avons montré que seule la construction hSK3 comportant un motif d'hémagglutinine sur l'extrémité N-terminale possède les caractéristiques électrophysiologiques des courants hSK3 ainsi qu'une sensibilité à l'Ohmlin et à la FSK + CI-1044 proches de celles du courant hSK3. En effet, la construction avec le motif HA sur la boucle extracellulaire n°2 n'a pas montré d'expression de la protéine SK3. Cette construction doit probablement être séquestrée au niveau du RE et demeurée sous forme d'ARNm sans être traduite en protéine. Cela montre le rôle important de ce domaine pore sur la traduction

protéique de SK3. La deuxième construction, comportant le motif HA sur la boucle E3, n'était pas sensible ni à la FSK + CI-1044 ni à l'Ohmlin. Par ailleurs, le canal hSK3 HA (E3), insensible à l'apamine, peut-être inhibé de façon transitoire par le tétra-éthyle-ammonium (TEA). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces deux derniers composés bloquent le canal SK3 en partie en se fixant sur des sites localisés au niveau du pore du canal et il est probable que le positionnement de l'étiquette HA au niveau de la boucle extracellulaire n°3 ait dû modifier l'accessibilité au pore du canal de ces bloqueurs pharmacologiques. Seule la 4-aminopyridine (4-AP) a inhibé l'activité du canal hSK3 HA (E3) de cette construction. Le mécanisme d'action de la 4-AP n'est pas encore bien élucidé mais cette molécule possède des propriétés particulières par rapport au TEA comme le blocage des canaux K^+ lorsqu'ils sont dans un état fermé (Remillard & Leblanc, 1996). Il est probable que la 4-AP agisse sur un site situé en dehors du pore du canal.

La protéine hSK3 HA (E3) n'a pas été retrouvée présente dans les radeaux lipidiques ce qui suggère que le motif a dû perturber l'association du canal SK3 avec le cholestérol. En effet, la protéine SK3 possède des motifs CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus) dont l'un est situé à proximité du pore (données d'Ana Bouchet du laboratoire). Le canal hSK3 HA (E3) n'est pas sensible à la FSK+CI-1044 probablement car ce canal est en dehors des nanodomains riches en cholestérol et il ne serait pas localisé à proximité des complexes transmembranaires tels que AKAP-PKA-PDE-Epac (qui sont dans les nanodomains) permettant de réguler le niveau de phosphorylation et le niveau d'activité de protéines transmembranaires comme il a pu être observé avec les canaux Ca^{2+} CaV1 (Gao *et al.*, 1997). En effet, il existerait une compartimentation de l'AMPc à l'intérieur de la cellule, plus exactement au niveau de nanodomains riches en cholestérol et en sphingolipides. Ainsi des complexes protéiques et de kinases, AKAP-PKA-PDE-Epac sont localisés à proximité de la membrane plasmique. Ils permettraient de réguler la concentration locale d'AMPc. Le canal SK3 est localisé dans les nanodomains riches en cholestérols et est probablement à proximité de ces complexes pour avoir son activité régulée finement par de faibles concentrations d'AMPc.

La FSK + CI-1044 diminue l'activité du canal SK3 en phosphorylant les résidus sérines par l'action de la PKA activée par l'AMPc intracellulaire (Clarysse *et al.*, 2013). Nous avons montré que la sérine 289 (hSK3) ou 285 (rSK3) sont responsables de la moitié des effets inhibiteurs induits par l'activation de la voie AMPc-PKA. Les courants SK3 humains étiquetés HA sur la région N-terminale ont des amplitudes plus faibles que le SK3 humain non HA. Les cellules hSK3 HA N-terminale comportent alors moins de canaux fonctionnels à

la membrane plasmique que les cellules avec le canal hSK3. Comme le pourcentage d'effet de la FSK + CI-1044 et de l'Ohmline est le même pour hSK3 et hSK3 HAN-terminale cela indique que l'étiquette HA n'a pas modifié la sensibilité du hSK3 à la FSK + CI-1044 et à l'Ohmline. Ces résultats montrent que malgré une diminution d'amplitude des courants, ce canal avec une étiquette HA en N-terminale peut être utilisé pour les prochaines études visant à caractériser les effets de la voie AMPc-PKA sur le canal SK3.

Il a été démontré au laboratoire que la PKA en phosphorylant le canal SK3 sur un ou des résidus sérines inhibait l'activité du canal SK3 et par conséquent réduisait l'entrée constitutive de Ca^{2+} entraînant alors une réduction de la migration des cellules cancéreuses (Clarysse *et al.*, 2013). Sept résidus sérines des domaines N et C-terminaux cytoplasmiques du canal SK3 peuvent être la cible de la PKA dont 4 dans la région N-terminale. La mutation de la sérine 289 du canal hSK3 HA N-terminale a réduit de 46%, au lieu de 90%, l'effet de la FSK + CI-1044 de façon comparable à ce que nous avons observé pour le rSK3 suite à la mutation de la sérine 285 (qui était de 43%). Cette sérine pourrait donc être responsable de la moitié des effets inhibiteurs induits par la PKA. Nous nous sommes ensuite focalisés sur les autres sérines potentiellement phosphorylables par la PKA de la partie N-terminale du canal SK3. Chacun de ces résidus ont été mutés par mutagenèse dirigée et l'effet de la FSK+CI-1044 a été testé. La mutation des 4 sérines a encore plus réduit l'effet de la FSK + CI-1044 sur l'amplitude du courant SK3 soit une diminution supplémentaire de 12,4%. Ainsi, les résidus sérines mutés de SK3 sont bien des sites cibles de la PKA.

La mutation des résidus sérines dans la région N-terminale a donc permis de diminuer l'effet de la stimulation de la voie AMPc-PKA sur l'activité du canal SK3 mais pas complètement car il reste encore près de 34% du courant qui est encore réduit par la FSK + CI-1044. Cela veut dire que la PKA exerce toujours une régulation négative du canal en phosphorylant probablement les sérines présentes sur la partie C-terminale de la protéine ou sur d'autres résidus telle que la thréonine 581, retrouvée commune entre les isoformes rSK1 et rSK3 et hSK1. Il serait alors intéressant de muter ces sérines et cette thréonine et d'observer l'effet de FSK + CI-1044 sur le courant SK3. Il serait également intéressant d'utiliser des chimères SK3-SK4 (Jenkins *et al.*, 2010). En effet, des chimères, comportant l'extrémité N-terminale de SK4 sans site pour la PKA et le reste de la protéine SK3, permettraient de confirmer nos résultats et d'étudier le rôle des 3 résidus sérines de SK3 situés en C-terminale.

L'observation faite que l'amplitude du courant hSK3 HA S289A soit plus grande que le courant hSK3 HAN-terminale (Mann-Whitney $p = 0,001$) suggère que la sérine S289A doit être constitutivement phosphorylée par la PKA, d'où la différence d'amplitude constatée. Il a

été montré au laboratoire que le canal SK3 favorisait la migration des cellules cancéreuses et le développement de métastases osseuses (Chantôme *et al.*, 2009, 2013). Par ailleurs, la phosphorylation du canal SK3 par la PKA avait pour conséquence de réduire l'activité du canal SK3 tout en entraînant la dissociation du complexe SK3-Orai1 hors des radeaux lipidiques. Cela avait aussi pour conséquence de diminuer l'entrée du Ca^{2+} et de réduire la migration des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-435s (Clarysse *et al.*, 2013). Il serait intéressant de transfecter les cellules MDA-MB-435s-shSK3 (n'exprimant plus le canal hSK3) avec la construction du canal humain muté en ses 4 sérines ou bien avec juste la mutation en 289 et de tester les conséquences biologiques de ces mutations sur l'activité du canal SK3, l'association en complexe SK3-Orai1, ainsi que sur la migration et l'entrée de Ca^{2+} dépendante du canal SK3.

Nous avons aussi démontré la capacité de l'Ohmlin à réduire le développement de métastases osseuses en ciblant le canal SK3 (Chantôme *et al.*, 2013). D'un point de vue mécanistique l'Ohmlin s'intègre dans les membranes (données en cours de publication, Ana Bouchet) et dissocie le complexe SK3-Orai1 entraînant alors la diminution de l'entrée constitutive de Ca^{2+} , de la migration cellulaire et du développement des métastases (Chantôme *et al.*, 2013). L'activité du canal SK3 est également inhibée par phosphorylation par la PKA des résidus sérines entraînant alors une dissociation du complexe SK3-Orai1 et une diminution de la migration dépendante du canal SK3 (Clarysse *et al.*, 2013). L'un des objectifs de ma thèse était alors de tester l'hypothèse selon laquelle l'Ohmlin favorise la phosphorylation du canal SK3 par la voie AMPc-PKA. Nos résultats montrent que les mutations du canal humain SK3 sur ses résidus sérines de la partie N-terminale ne modifient pas l'efficacité de l'Ohmlin à réduire l'activité du canal SK3 (Tableau 21). En effet, l'Ohmlin a diminué de 50,7% l'amplitude du courant du canal hSK3, pour 54,5% chez le canal hSK3 HA et de 48,6% pour le canal SK3 HA muté S289A-S197A-S172A-S133A. Ces résultats n'ont pas montré de différence d'effet de l'Ohmlin sur ces 3 courants. Ces résultats suggèrent que l'Ohmlin ne favorise pas la phosphorylation du canal SK3 en agissant sur les résidus sérine de la partie N-terminale suite à une activation de la voie AMPc-PKA. Cependant, on ne peut pas exclure que l'Ohmlin favorise la phosphorylation du canal SK3 en agissant sur d'autres résidus cibles de la PKA. L'Ohmlin a délocalisé la protéine hSK3 HA N-terminale comme observée pour la protéine rSK3 alors qu'elle n'a pas d'effet sur la protéine hSK3 HA (E3). Contrairement à la protéine hSK3 HA (E3), la protéine hSK3 HA N-terminale se trouve dans les nanodomains lipidiques et un prétraitement à l'Ohmlin de 300 nM a conduit à délocaliser partiellement SK3 de ces nanodomains. Des données non

publiées du laboratoire (Ana Bouchet) et issues de la modélisation, montrent que l'Ohmlin déplace le groupement hydroxyle du cholestérol de ses principaux sites d'interaction, aboutissant à un nouveau réarrangement de ces groupements avec d'autres lipides et probablement aussi avec la protéine SK3. Il est probable que le cholestérol n'interagisse plus avec le canal hSK3 HA (E3) contrairement au canal hSK3 HA N-terminale. L'application de méthyl- β -cyclodextrine, permettant de réduire la quantité de cholestérol inclus dans la membrane plasmique des cellules, a permis de diminuer de 45% l'amplitude des courants des canaux hSK3 HA N-terminale. Cela conforte l'idée que l'activité du canal est dépendante du cholestérol. De même, il est possible que la délocalisation du canal des nanodomains riche en cholestérol entraîne l'internalisation des canaux par endocytose.

Conclusions

Lors de cette thèse, la stimulation de la voie AMPc-PKA sur l'activité du canal SK3 humain a été étudiée. Il a été observé que l'activité du canal de rat est diminuée par la phosphorylation des résidus sérine de la protéine SK3 par la PKA. Nous avons confirmé que l'activation de la voie AMPc-PKA réduisait également le courant SK3 humain. Les sérines 285 et 289 respectivement présentent au niveau des extrémités N-terminales du canal SK3 de rat et humain sont responsables de près de la moitié des effets inhibiteurs de la stimulation de la voie AMPc-PKA sur le canal SK3. Les autres résidus sérines de l'extrémité N-terminale sont responsables de près de 10% d'effets supplémentaires. Cependant les sérines de l'extrémité N-terminale ne sont pas les seules responsables de la régulation de l'activité du canal SK3 par la voie AMPc-PKA. Les résidus sérines de l'extrémité C-terminale pourraient être également des cibles de la voie AMPc-PKA. Il serait intéressant de muter ces sérines et d'étudier l'effet de la stimulation de la voie AMPc-PKA sur le courant hSK3. Les mutations des sérines présentes sur l'extrémité N-terminale du canal SK3 ne modifient pas la capacité de l'Ohmlin à réduire l'activité du canal hSK3. Ces résultats suggèrent que l'Ohmlin ne favorise pas la phosphorylation du canal SK3 en position N-terminale en activant la voie AMPc-PKA. Les mécanismes de signalisation régulant l'activité du canal SK3 sont donc différents entre stimulation de la voie AMPc-PKA et Ohmlin. Il faudrait cependant tester l'Ohmlin sur le courant hSK3 après mutation des résidus sérines de l'extrémité C-terminale.

Nos données ont montré que la protéine $\alpha 1D$ qui est surexprimée dans les cancers colorectaux régule la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du côlon HCT-116. Cette protéine $\alpha 1D$ contrôle également la concentration cytosolique de Ca^{2+} par un mécanisme qui ne dépend pas de son activité canalaire à la membrane plasmique mais en faisant intervenir un échangeur Na^+ / Ca^{2+} , probablement le NCX1 et / ou le NCX3. La régulation du Ca^{2+} dans les cellules HCT-116 est également dépendante de l'activité des canaux SK3, qui, favorisant une entrée (SOCE) du Ca^{2+} dans les cellules par les canaux ne dépendant pas du potentiel (Orai1 et TRPC1), permet l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique favorisant la migration des cellules HCT-116 (Guéguinou *et al.*, 2016). La figure 67 montre comment ces deux mécanismes pourraient réguler la concentration de Ca^{2+} cytosolique et la migration des cellules exprimant le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$.

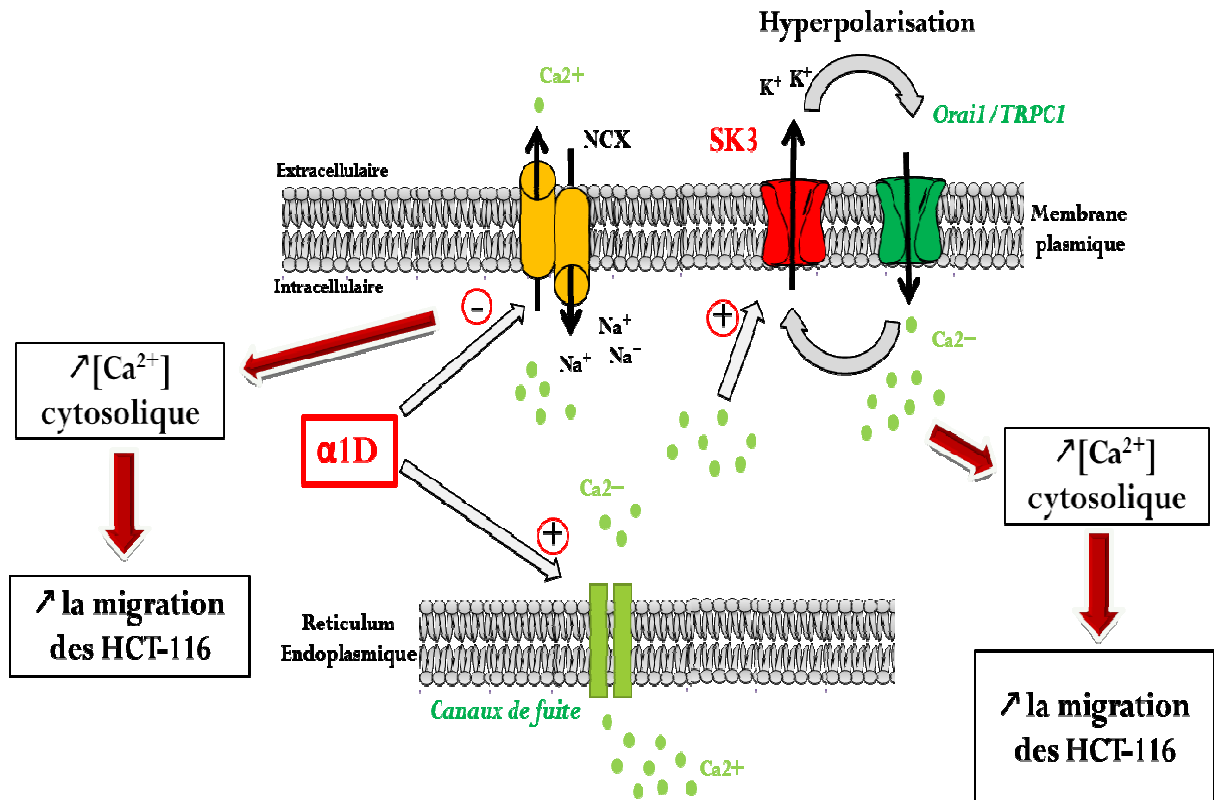


Figure 67 : Représentation hypothétique des mécanismes de régulation du Ca^{2+} intracellulaire favorisant la migration des cellules cancéreuses exprimant le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$.

La libération du Ca^{2+} du RE (fuite ou induite par la vidange du Ca^{2+} du RE) active le canal SK3. L'activation de SK3 induit l'hyperpolarisation de la membrane plasmique permettant d'augmenter l'entrée de Ca^{2+} par les canaux ne dépendants pas du potentiel (Orai1 et TRPC1). Cette entrée de Ca^{2+} (SOCE) augmente la concentration de Ca^{2+} cytosolique et la migration cellulaire. La sous-unité $\alpha 1D$ participe à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique en favorisant l'extrusion du Ca^{2+} du RE (voir Figure 4E du papier avec la pente TG) et permet le maintien de la concentration de Ca^{2+} cytosolique en inhibant l'échangeur Na^+ / Ca^{2+} (NCX) à la membrane plasmique (voir Figure 5B du papier avec le T1/2). Ainsi, le canal SK3 et la protéine $\alpha 1D$ favorisent conjointement la migration cellulaire.

Bibliographie

A

- Abdel-malak, N. A., Srikant, C. B., Kristof, A. S., Magder, S. A., Battista, J. A., & Hussain, S. (2007). Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1 – dependent autocrine production of interleukin-8. *Blood*, *111*(8), 4145–4155.
- Abiraman, K., Sah, M., Walikonis, R. S., Lykotrafitis, G., & Tzingounis, A. V. (2016). Tonic PKA Activity Regulates SK Channel Nanoclustering and Somatodendritic Distribution. *Journal of Molecular Biology*, *428*(11), 2521–2537.
- Adelman, J. P., Maylie, J., & Sah, P. (2012). Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels : Form and Function. *Annu Rev Physiol*.
- Alberts, B., A JohnsLewis, J., Raff, M., & Roberts, K. (2003). Book Reviews. *Annals of Botany*, 2003.
- Alexander, S. P. H., Catterall, W. A., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J. A., Benson, H. E., *et al.*(2015). The concise guide to pharmacology 2015 / 16 : voltage-gated ion channels catsper and two-pore channels. *British Journal of Pharmacology*, 5904–5941.
- Alinezhad, S., Väänänen, R., Mattsson, J., Li, Y., Tallgrén, T., Ochoa, N. T., *et al.*(2016). Validation of Novel Biomarkers for Prostate Cancer Progression by the Combination of Bioinformatics , Clinical and Functional Studies. *Plos*.
- Allen, D., Fakler, B., Maylie, J., & Adelman, J. P. (2007). Organization and Regulation of Small Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channel Multiprotein Complexes. *The Journal of Neuroscience*, *27*(9), 2369–2376.
- Altimimi, H. F., & Schnetkamp, P. P. (2007). ND ES SC Introduction. *Channels*, *6950*(May 2017).
- Andres, D., Keyser, B. M., Petrali, J., Benton, B., Hubbard, K. S., Mcnutt, P. M., & Ray, R. (2013). Morphological and functional differentiation in BE (2) -M17 human neuroblastoma cells by treatment with Trans -retinoic acid. *Bioorganic Medicinal Central Neuroscience*, 14-49.
- Andres, M. A., Baptista, N. C., Efir, J. T., Ogata, K. K., Bellinger, F. P., & Zeyda, T. (2009). Depletion of SK1 channel subunits leads to constitutive insulin secretion. *FEBS Letters*, *583*(2), 369–376.
- Andrikopoulos, P., Fraser, S. P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., *et al.*(2011). Angiogenic Functions of Voltage-gated Na⁺ Channels in Human Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(19), 16846–16860.
- Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Harwood, S. M., Baba, A., Matsuda, T., Barbeau, O., *et al.* (2015). Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require Ca²⁺ Influx through the Na⁺/Ca²⁺. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(30), 18412–18428.

- Annunziato, L., Pignataro, G., & Renzo, G. F. (2004). Pharmacology of Brain $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger: From Molecular Biology to Therapeutic Perspectives. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 633–654.
- Appert-Collin, A., Hubert, P., CREMEL, G., & Bennasroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in Pharmacology*, 6(November), 1–10.
- Arikkath, J., & Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 298–307.
- Aung, C. S., Ye, W., Plowman, G., Peters, A. A., Monteith, G. R., & Roberts-Thomson, S.J. (2009). Plasma membrane calcium ATPase 4 and the remodeling of calcium homeostasis in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(11), 1962–1969.

B

- Baggott, R. R., Alfranca, A., López-maderuelo, D., Mohamed, T. M., Escolano, A., Oller, J., *et al.* (2014). Plasma Membrane Calcium ATPase Isoform 4 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor – Mediated Angiogenesis Through Interaction With Calcineurin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2310-2320.
- Bannister, J. P., Leo, M. D., Narayanan, D., Jangsangthong, W., Nair, A., Evanson, K. W., *et al.* (2013). C-terminus fragment is a bi-modal vasodilator. *J Physiol*, 12, 2987–2998.
- Bannister, R. A., Pessah, I. N., & Beam, K. G. (2009). The Skeletal L-type Ca^{2+} Current Is a Major Contributor to Excitation-coupled Ca^{2+} entry. *The Journal of General Physiology*, 79–91.
- Belmeguenai, A., Hosy, E., Bengtsson, F., Pedroarena, C. M., Piochon, C., Teuling, E., *et al.* (2010). Intrinsic Plasticity Complements Long-Term Potentiation in Parallel Fiber Input Gain Control in Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience*, 30(41), 13630–13643.
- Bernstein, G. M., & Jones, O. T. (2007). Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: Role of the $\alpha_2\delta$ subunit, 41, 27–40.
- Berthe, W., Sevrain, C. M., Chantôme, A., Bouchet, A. M., Gueguinou, M., Fourbon, Y., *et al.* (2016). New Disaccharide-Based Ether Lipids as SK3 Ion Channel Inhibitors. *ChemMedChem*, 1–10.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., *et al.* (2000). The I-II loop of the Ca^{2+} channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, 25(1), 177–190.
- Bond, C. T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1999). Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Annals of the New York Academy of Science*, 370–378.

- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiological Reviews*, (79), 1341–1378.
- Brini, M., & Carafoli, E. (2011). The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–15.
- Brown, A., Cornwell, T., Korniyenko, I., Solodushko, V., Bond, C. T., Adelman, J. P., *et al.* (2007). Myometrial expression of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels depresses phasic uterine contraction. *J. Physiol.*, 36688, 832–840.
- Buchanan, P. J., & McCloskey, K. D. (2016). CaV channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics. *European Biophysics Journal*.
- Budde, T., Meuth, S., & Pape, H. (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nature Review*, 3(November).
- Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The β Subunit of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Physiological Reviews*, 90(4), 1461–1506.
- Burdyga, A., Conant, A., Haynes, L., Zhang, J., Jalink, K., Sutton, R., *et al.* (2013). Biochimica et Biophysica Acta cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Effects of PKA and EPAC. *BBA - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2664–2672.

C

- Cabral, M. D., Paulet, P., Robert, V., & Gomes, B. (2010). Knocking Down CaV1 Calcium Channels Implicated in Th2 Cell Activation Prevents Experimental Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 181, 1310–1317.
- Cai, Y., Nagel, D. J., Zhou, Q., Cygnar, K. D., Zhao, H., Li, F., *et al.* (2015). Role of cAMP-Phosphodiesterase 1C Signaling in Regulating Growth Factor Receptor Stability, Vascular Smooth Muscle. *Circulation Research*.
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M. W., *et al.* (2005). The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. *PNAS*, 102(32), 11230–11235.
- Carabelli, V., Lovallo, M., Magnelli, V., Zucker, H., & Carbone, E. (1996). Voltage-Dependent Modulation of Single N-Type Ca²⁺ Channel Kinetics by Receptor Agonists in IMR32 Cells. *Biophysical Journal*, 70(5), 2144–2154.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–23.

- Catterall, W. A., Perez-reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International union of pharmacology . XLVIII. nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411–425.
- Chanrion, M., Kuperstein, I., Barriere, C., Marjou, F. El, Cohen, D., Kuperstein, I., *et al.*(2014). metastasis in mouse gut. *Nature Communications*.
- Chantôme, A., Girault, A., Potier, M., Collin, C., Vaudin, P., Pagès, J., *et al.*(2009). melanoma cell motility. *Experimental Cell Research*, 315(20), 3620–3630.
- Chantôme, A., Potier-Cartereau, M., Clarysse, L., Fromont, G., Marionneau-Lambot, S., Guéguinou, M., *et al.*(2013). Pivotal role of the lipid raft SK3-orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Research*, 73(15), 4852–4861.
- Charras, G., & Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature*, volume 9 (September2008).
- Chen, M. X., Shelby, C., Bill, A. G., Singh, K., Hieble, J. P., Michel, M. C., *et al.* (2004). Small and intermediate conductance Ca²⁺activated K⁺ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Archives Pharmacology*, 3, 602–615.
- Chen, Y., Chiu, W., & Shen, M. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 20:23
- Chen, Y., Hsu, K., & Shen, M. (2016). Biochimica et Biophysica Acta The store-operated Ca²⁺ entry-mediated signaling is important for cancer spread. *BBA - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1427–1435.
- Chiamvimonvat, N., Chen-izu, Y., Clancy, C. E., Deschenes, I., Dobrev, D., Heijman, J., *et al.* (2017). Potassium currents in the heart : functional roles in repolarization , arrhythmia and therapeutics. *J. Physiol.*, 7, 2229–2252.
- Christophersen, P., & Wulff, H. (2015). Pharmacological gating modulation of small- and intermediate-conductance Ca²⁺ C-activated KC. *Channels*, 6950(April 2017).
- Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-reyes, E., & Swartz, K. J. (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin, 1(8).
- Chubanov, V., Schnitzler, M. M., Meißner, M., & Schäfer, S. (2012). Natural and synthetic modulators of SK (Kca2) activity of the kinase-coupled cation channel TRPM7. *British Journal of Pharmacology*, 3.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 13–22.
- Clark, K., Langeslag, M., Leeuwen, B. Van, Ran, L., Ryazanov, A. G., Figdor, C. G., *et al.*

- (2006). TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO Journal*, 25(2), 290–301.
- Clarysse, L., Guéguinou, M., Potier-Cartereau, M., Vandecasteele, G., Bougnoux, P., Chevalier, S., *et al.* (2013). cAMP-PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca²⁺ entry and cancer cell migration by regulation of SK3-Orai1 complex. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 466(10), 1921–1932.
- Connor, J., Sawczuk, S., Benson, M. C., Tomashefsky, P., Otoole, K. M., Olsson, C. A., & Buttyan, R. (1988). Calcium Channel Antagonists Delay Regression of Androgen-Dependent Tissues and Suppress Gene Activity Associated With Cell Death. *The Prostate*, 130, 119–130.
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases : Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu Rev Biochem*.
- Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J., & Jin, C. (2003). Phosphodiesterases as Critical Components of Cyclic AMP Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, (16).
- Cross, B. M., Breitwieser, G. E., Reinhardt, T. A., & Rao, R. (2014). Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer : from physiology to pathology.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., & Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(1), 3–17.

D

- Davenport, B., Li, Y., Heizer, J. W., Schmitz, C., & Perraud, A. L. (2015). Signature channels of excitability no more: L-type channels in immune cells. *Frontiers in Immunology*, 6(July), 1–13.
- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Minh, A. T., Foucault, I., *et al.* (2006). The Calcium Channel $\alpha_2\delta_2$ Subunit Partitions with Ca_v2.1 into Lipid Rafts in Cerebellum : Implications for Localization and Function. *The Journal of Neuroscience*, 26(34), 8748–8757.
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-laviada, A., Douglas, L., Nieto-rostro, M., Bauer, C. S., *et al.* (2009). The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins , a posttranslational modification essential for function. *PNAS*.
- Dilly, S., Poncin, S., Lamy, C., Liégeois, J., & Seutin, V. (2012). Zoom sur les canaux SK pharmacologie et modélisation de canaux potassiques. *Médecines Sciences*, 395–402.
- Diness, J. G., Bentzen, B. H., Sørensen, U. S., & Grunnet, M. (2015). Role of Calcium-activated Potassium Channels in Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 66(5), 441–448.

- Doan, L. (2010). Voltage-gated calcium channels and pain. *YTRAP*, 14(2), 42–47.
- Dolga, A. M., Netter, M. F., Perocchi, F., Doti, N., Meissner, L., Tobaben, S., *et al.* (2013). Mitochondrial Small Conductance SK2 Channels Prevent Glutamate-induced Oxytosis and Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10792–10804.
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M., & Greenberg, M. E. (2001). Signaling to the Nucleus by an L-type Calcium Channel – Calmodulin Complex Through the MAP Kinase Pathway. *Science*, 294(October), 333–340.
- Dong, H., Claffey, K. P., Brocke, S., & Epstein, P. M. (2015). Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. *Breast Cancer Research and Treatment*, 152(1), 17–28.
- Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., & Palaniyar, N. (2015). SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *PNAS*.

E

- Nguidjoe E, & Herchuelz, A. (2007). Overexpression of Na / Ca Exchanger Reduces Viability and Proliferation of Gliosarcoma Cells. *New York Academy of Sciences*, 468, 2007.
- Eder, P., Probst, D., Rosker, C., Poteser, M., & Wolinski, H. (2007). Phospholipase C-dependent control of cardiac calcium homeostasis involves a TRPC3-NCX1 signaling complex. *Cardiovascular Research*, 73, 111–119.

F

- Faber, E. S. L. (2010). Functional interplay between NMDA receptors , SK channels and voltage-gated Ca²⁺ channels regulates synaptic excitability in the medial prefrontal cortex. *J Physiol*, 8, 1281–1292.
- Faber, E. S., Delaney, A. J., Power, J. M., Sedlak, P. L., Crane, J. W., & Sah, P. (2008). Modulation of SK Channel Trafficking by Beta Adrenoceptors Enhances Excitatory Synaptic Transmission and Plasticity in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 28(43), 10803–10813.
- Faddy, H. M., Smart, C. E., Xu, R., Lee, G. Y., Kenny, P. A., Feng, M., *et al.* (2008). Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Fan, L., Li, A., Li, W., Cai, P., Yang, B., & Zhang, M. (2014). ScienceDirect Novel role of Sarco / endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 in development of colorectal cancer and its regulation by F36 , a curcumin analog. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 68(8), 1141–1148.
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., *et al.* (2010). Store-

Independent Activation of Orail by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell*, 143(1), 84–98.

Fourbon, Y., Guéguinou, M., Felix, R., Constantin, B., Uguen, A., Fromont, G., *et al.*(2017). Ca²⁺ protein alpha 1D of CaV1.3 regulates intracellular calcium concentration and migration of colon cancer cells through a non-canonical activity. *Sci Rep*. 2017 Oct 27;7(1):14199.

Fox, B. Y., Nowyckyt, M. C., Tsient, R. W., & College, M. (1987). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones, 173–200.

Franco, S. J., & Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration : calpains make the cut. *Journal of Cell Science*,doi:10.1242/jcs.02562

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Tumour-Cell Invasion and Migration : Diversity and Escape Mechanisms*, 3(May), 362–374.

Fuller, M. D., Emrick, M. A., Sadilek, M., Scheuer, T., & William, A. (2011). Molecular Mechanism of Calcium Channel Regulation in the Fight-or-Flight Response. *Science Signal*, 3(141), 1–19.

G

Gandalovičová, A., Vomastek, T., Rosel, D., & Brábek, J. (2016). Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget*, 7(18).

Gao, T., Bu, M., Gerhardstein, B. L., Ma, H., & Hosey, M. M. (2000). Role of the C terminus of the $\alpha 1C$ (CaV1.2) Subunit in Membrane Targeting of Cardiac L-type Calcium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25436–25444.

Gao, T., Yatani, A., Acqua, M. L., Sako, H., Green, S. A., Dascal, N., *et al.*(1997). cAMP-Dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Requires Membrane Targeting of PKA and Phosphorylation of Channel Subunits. *NEURON*, 19, 185–196.

Gao, Y., Chotoo, C. K., Balut, C. M., Sun, F., Bailey, M. A., & Devor, D. C. (2008). Role of S3 and S4 Transmembrane Domain Charged Amino Acids in Channel Biogenesis and Gating of KCa2.3 and KCa3.1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9049–9059.

Garcia-prieto, C., Begam, K., Ahmed, R., Chen, Z., Zhou, Y., Hammoudi, N., *et al.*(2013). Effective Killing of Leukemia Cells by the Natural Product OSW-1 through Disruption of Cellular Calcium Homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3240–3250.

Gerhardstein, B. L., Gao, T., Bu, M., Puri, T. S., Adair, A., Ma, H., *et al.*(2000). Proteolytic Processing of the C Terminus of the $\alpha 1C$ Subunit of L-type Calcium Channels and the Role of a Proline-rich Domain in Membrane Tethering of Proteolytic Fragments. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8556–8563.

- Girault, A., Bougnoux, P., Joulin, V., & Vandier, C. (2012). Targeting SKCa Channels in Cancer : Potential New Therapeutic Approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 697–713.
- Gomez-ospina, N., Panagiotakos, G., Portmann, T., Pasca, S. P., Rabah, D., Budzillo, A., *et al.*(2013). A Promoter in the Coding Region of the Calcium Channel Gene CACNA1C Generates the Transcription Factor CCAT. *Plos One*, 8(4).
- Gomez-ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-chang, O., Hu, L., & Dolmetsch, R. (2006). The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell*, 591–606.
- Goncharova, E. A., Khavin, I. S., Goncharov, D. A., & Krymskaya, V. P. (2012). Differential effects of formoterol on thrombin- and PDGF-induced proliferation of human pulmonary arterial vascular smooth muscle cells. *Respiratory Research*, 13(1), 1.
- Graef, I. A., Mermelstein, P. G., Stankunas, K., Neilson, J. R., Deisseroth, K., Tsien, R. W., & Crabtree, G. R. (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons, 1–6.
- Grassi, C., Ascenzo, M. D., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., & Battista, G. (2004). Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 35, 307–315.
- Gray, A. C., Raingo, J., & Lipscombe, D. (2007). Neuronal calcium channels : Splicing for optimal performance, 42, 409–417.
- Grice, D. M., Vetter, I., Faddy, H. M., Kenny, P. A., Roberts-thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2010). Golgi Calcium Pump Secretory Pathway Calcium ATPase 1 (SPCA1) Is a Key Regulator of Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF1R) Processing in the Basal-like Breast CancerCell Line MDA-MB-231. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37458–37466.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450.
- Guéguinou, M., Chantôme, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., & Potier-Cartreau, M. (2014). KCa and Ca²⁺ channels: The complex thought. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2322–2333.
- Gueguinou, M., Crottès, D., Chantôme, A., Clarysse, L., Girault, A., *et al.* (2017). The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca²⁺ homeostasis. *Oncogene*. 2017 Jun 22;36(25):3640-3647.

- Guéguinou, M., Gambade, A., Félix, R., Chantôme, A., Fourbon, Y., Bougnoux, P., *et al.*(2015). Lipid rafts, KCa/CICa/Ca²⁺ + channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(10), 2603–2620.
- Guéguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Gambade, A., Chantôme, A., *et al.*(2016). SK3 / TRPC1 / Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration : a novel opportunity to modulate anti- EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget*, 7(24).
- Gurnett, C. A., Felix, R., & Campbell, K. P. (1997). Extracellular Interaction of the Voltage-dependent Ca²⁺ Channel $\alpha_2\delta$ and α_1 Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18508–18512.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., *et al.* (2003). International Union of Pharmacology . XLI . Compendium of Voltage-Gated Ion Channels : Potassium Channels. *Physiological Reviews*, 55(4), 583–586.

H

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Pflügers Archiv Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 85–100.
- Hao, J., Bao, X., Jin, B., Wang, X., Mao, Z., Li, X., *et al.* (2015). Ca²⁺ channel subunit α_1D promotes proliferation and migration of endometrial cancer cells mediated by 17 - estradiol via the G protein-coupled estrogen receptor. *The FASEB Journal*, 1–11.
- Haug-Collet, K., Pearson, B., Webel, R., Szerencsei, R., Winkfein, R. ., Schnetkamp, P. P., & Colley, N. (1999). Cloning and Characterization of a Potassium-dependent Sodium/ Calcium Exchanger. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 659–669.
- Hegedus, L., Garay, T., Moln, E., Wolf, M., & Grusch, M. (2017). The plasma membrane Ca²⁺-pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells. *International Journal of Cancer*, 2770, 2758–2770.
- Held, B., Freise, D., Freichel, M., Hoth, M., & Flockerzi, V. (2002). Skeletal muscle L-type Ca²⁺ current modulation in α_1D -deficient and wildtype murine myotubes by the α_1D subunit and cAMP. *Journal of Physiology*, 459–468.
- Hernandez-Guijo, J. M., Carabelli, V., Gandia, L., Garcia, A. G., *et al.*(1999). Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP , opioids and catecholamines in rat chromafin cells. *European Journal of Neuroscience*, 11(May), 3574–3584.
- Hernández, A., Jiménez, N., García, A. G., & Modulation, H. A. (2011). Modulation by

- endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. *J. Physiol.*, (67), 610–623.
- Herrera, G. M., Pozo, M. J., Zvara, P., Petkov, G. V., Bond, C. T., Adelman, J. P., & Nelson, M. T. (2003). Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. *J Physiol*, 893–903.
- Hilge, M., Aelen, J., Vuister, G. W., & Nijmegen, E. D. (2006). Ca²⁺ Regulation in the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Involves Two Markedly Different Ca²⁺ Sensors. *Molecular Cell*, 15–25.
- Hirschberg, B., Maylie, J., Adelman, J. P., & Marrion, N. V. (1998). Gating of Recombinant Small-Conductance Ca-activated K⁺ Channels by Calcium. *J GEN PHYSIOL*, 111(April).
- Hofmann, F., Mori, Y., & Perez-reyes, E. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *NEURON*, 25, 533–535.
- Honrath, B., Krabbendam, I., Culmsee, C., & Dolga, A. (2017). Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in the plasma membrane, mitochondria and the ER: Pharmacology and implications in neuronal diseases. *Neurochemistry International*.
- Hosy, E., Piochon, C., Teuling, E., Rinaldo, L., & Hansel, C. (2011). SK2 channel expression and function in cerebellar Purkinje cells. *J Physio*, 14, 3433–3440.
- Hotta, A., Nakamura, E., Yoshihiko, K., Yamamoto, Y., & Suzuki, H. (2005). Effects of inhibitors of nonselective cation channels on the acetylcholine-induced depolarization of circular smooth muscle from the guinea-pig stomach antrum. *Smooth Muscle Res*, 41, 313–327.
- Howe, A. K., Baldor, L. C., & Hogan, B. P. (2005). Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *PNAS*, 102(40).
- Huang, H., Yu, D., & Soong, T. W. (2013). C-Terminal Alternative Splicing of Ca V 1 . 3 Channels Distinctively Modulates Their Dihydropyridine Sensitivity. *Molecular Pharmacology*, 1521-0111
- Huang, X., & Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *Journal of Cell Biology*, 206(2), 151–162.
- Huc, S., Monteil, A., Bidaud, I., Barbara, G., Chemin, J., & Lory, P. (2009). Biochimica et Biophysica Acta Regulation of T-type calcium channels: Signalling pathways and functional implications. *BBA - Molecular Cell Research*, 1793(6), 947–952.
- Hulme, J. T., Yarov-yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the Ca V 1 . 2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physio*, 1, 87–102.

I

- Iamshanova, O. (2017). Molecular mechanisms of tumour invasion : regulation. *J Physio*, 10(April 2016), 3063–3075.
- Ishii, T. M., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1997). Determinants of Apamin and d - Tubocurarine Block in SK Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23195–23200.

J

- Jacquemet, G., Baghirov, H., Georgiadou, M., Sihto, H., Peuhu, E., Cettour-janet, P., *et al.* (2016). L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nature Communications*, (7491).
- Jacquemet, G., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion , 3D migration and cancer cell invasion. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 23–31.
- Jaffrès, P., Gajate, C., Maria, A., Couthon-gourvès, H., Chantôme, A., Potier-cartereau, M., *et al.* (2016). Pharmacology & Therapeutics Alkyl ether lipids , ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 165, 114–131.
- Jenkins, M. A., Christel, C. J., Jiao, Y., Abiria, S., Kim, K. Y., Usachev, Y. M., *et al.* (2010). Ca²⁺ -dependent facilitation of Cav 1.3 Ca²⁺ channels by densin and Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neuroscience*, 30(15), 5125–5135.
- Jeong, J., Vanhouten, J. N., Dann, P., Kim, W., Sullivan, C., Yu, H., *et al.* (2016). PMCA2 regulates HER2 protein kinase localization and signaling and promotes HER2-mediated breast cancer. *PNAS*.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T., & Mackinnon, R. (2001). Structure of the RCK Domain from the E . coli K⁺ Channel and Demonstration of Its Presence in the Human BK Channel. *Neuron*, 29, 593–601.
- Joiner, W. J., Khanna, R., Schlichter, L. C., & Kaczmarek, L. K. (2001). Calmodulin Regulates Assembly and Trafficking of SK4 / IK1 Ca²⁺-activated K⁺ Channels. *Journal of Biophysical Chemistry*.

K

- Kamimura, D., Ohtani, T., Sakata, Y., Mano, T., Takeda, Y., Tamaki, S., *et al.* (2012). Ca²⁺ entry mode of Na⁺ / Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *European Heart Journal*, 1408–1416.
- Kang, H. W., Park, J. Y., & Lee, J. H. (2011). Molecular cloning and characterization of a hamster Cav1.3 Ca²⁺ channel variant with a long carboxyl terminus. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(6), 1629–1638.
- Karnabi, E., Qu, Y., Yue, Y., & Boutjdir, M. (2011). Calreticulin Negatively Regulates the Surface Expression of CaV1.3 L-Type Calcium Channel. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, 4(164), 1–13.

- Karnabi, E., Yongxia, Q., Yue, Y., & Boutjdir, M. (2013). Calreticulin Negatively Regulates the Surface Expression of CaV1.3 L-Type Calcium Channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (151), 1–13.
- Kellett, G. L. (2011). Alternative perspective on intestinal calcium absorption: proposed complementary actions of CaV1.3 and TRPV6. *International Life Science Institute*, 69(Area 3), 347–370.
- Khananshvili, D. (2013). Molecular Aspects of Medicine The SLC8 gene family of sodium – calcium exchangers (NCX) – Structure , function , and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 220–235.
- Kim, J., Kim, M., Kang, G. B., Park, C., & Eom, S. H. (2007). Crystal structure of the leucine zipper domain of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SKca) channel from *Rattus norvegicus*. *Proteins*, (October), 568–571.
- Kim, J. M., Lee, M., Kim, N., & Do, W. (2016). Optogenetic toolkit reveals the role of Ca²⁺ sparklets in coordinated cell migration. *PNAS*.
- Kleger, A., Seufferlein, T., Malan, D., Tischendorf, M., Storch, A., Wolheim, A., *et al.* (2010). Modulation of Calcium-Activated Potassium Channels Induces Cardiogenesis of Pluripotent Stem Cells and Enrichment of Pacemaker-Like Cells. *Circ Res AHA*.
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1996). Potassium Channels from Mammalian Brain KV4. *Science*, (22).

L

- Lamy, C., Goodchild, S. J., Weatherall, K. L., Jane, D. E., Liegeois, J. F., Seutin, V., & Marrion, N. V. (2010). Allosteric Block of KCa₂ Channels by Apamin. *J Biol Chem*, 285(35), 27067–27077.
- Lee, W. J., Roberts-thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2005). Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337, 779–783.
- Lee, W., Ngo-anh, T. J., Bruening-wright, A., Maylie, J., & Adelman, J. P. (2003). Small Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channels and Calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25940–25946.
- Lehmann, S., Boekhorst, V., Odenthal, J., Grenman, R., Rudin, M., Friedl, P., *et al.* (2017). Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Report Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Current Biology*, 27(3), 392–400.

- Li, W., & Aldrich, R. W. (2011). Electrostatic influences of charged inner pore residues on the conductance and gating of small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels. *PNAS*, *108*(15).
- Lim, C. J., Kain, K. H., Tkachenko, E., Goldfinger, L. E., Gutierrez, E., Allen, M. D., *et al.* (2008). Integrin-mediated Protein Kinase A Activation at the Leading Edge of Migrating Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(November), 4930–4941.
- Lin, M. T., Luján, R., Watanabe, M., Adelman, J. P., & Maylie, J. (2008). SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral- CA1 synapses. *Nature Neuroscience*, *11*(2), 170–177.
- Lopreiato, R., Giacomello, M., & Carafoli, E. (2014). Pump : New Ways to Look at an. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(15), 10261–10268.
- Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., *et al.* (2008). T-type Ca²⁺ Channel Expression in Human Esophageal Carcinomas: A Functional Role in Proliferation, *43*(1), 49–58.
- Lu, L., Sirish, P., Zhang, Z., Woltz, R. L., Li, N., Timofeyev, V., *et al.* (2015). Regulation of Gene Transcription by Voltage-gated L-type Calcium Channel, Ca_v 1.3. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 4663–4676.
- Lu, L., Zhang, Q., Timofeyev, V., Zhang, Z., Young, J. N., Shin, H., *et al.* (2007). Molecular Coupling of a Ca²⁺-Activated K⁺ Channel to L-Type Ca²⁺ Channels via a -Actinin2. *Circulation Research*.
- Lu, Z., & Mackinnon, R. (1994). Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K⁺ channel. *Nature*, volume 371 (15 September).
- Lysechko, T. L., Cheung, S. M., & Ostergaard, H. L. (2010). Regulation of the Tyrosine Kinase Pyk2 by Calcium Is through Production of Reactive Oxygen Species in Cytotoxic, *285*(41), 31174–31184.
- Lytton, J. (2007). Na⁺ / Ca²⁺ exchangers : three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochemistry*, *382*, 365–382.

M

- Maclennan, D. H., & Kranias, E. G. (2003). Phospholamban : a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature*, *4*(July), 566–577.
- Mahapatra, S., Marcantoni, A., Zuccotti, A., Carabelli, V., & Carbone, E. (2012). the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells. *J Physio*, *20*, 5053–5073.
- Mancarella, S., Yue, Y., Karnabi, E., Qu, Y., El-sherif, N., & Boutjdir, M. (2008). Impaired Ca²⁺ homeostasis is associated with atrial fibrillation in the α 1D L-type Ca²⁺ channel

- KO mouse. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 2017–2024.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., & Reimer, D. (2003). Functional role of L-type CaV1.3 Ca²⁺ channels in. *PNAS*, 100(9), 5543–5548.
- Marcantoni, A., Baldelli, P., Comunanza, V., Carabelli, V., & Carbone, E. (2007). L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells : Role in pace-making and secretion. *Cell Calcium*, 42, 397–408.
- Marques, R. (2015). 5 α -Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth. *Med Oncol*.
- Marrion, N. V., & Tavalin, S. J. (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*, 395(October).
- Matsuda, T., Arakawa, N., Takuma, K., Kishida, Y., Kawasaki, Y., Pharmacology, M., *et al.* (2001). SEA0400 , a Novel and Selective Inhibitor of the Na⁺ -Ca²⁺ Exchanger , Attenuates Reperfusion Injury in the in Vitro and in Vivo Cerebral Ischemic Models. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, 298(1), 249–256.
- Maylie, J., Bond, C. T., Herson, P. S., Lee, W., & Adelman, J. P. (2003). Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol*, 255–261.
- Mergler, S., Strauss, O., Strowski, M., Prada, J., Drost, A., Langrehr, J., *et al.* (2005). Insulin-Like Growth Factor-1 Increases Intracellular Calcium Concentration in Human Primary Neuroendocrine Pancreatic Tumor Cells and a Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cell Line (BON-1) via R-Type Ca²⁺ Channels and Regulates Chromogranin A Secretion i, 87–102.
- Micaroni, M., Giacchetti, G., Plebani, R., Xiao, G. G., & Federici, L. (2016). ATP2C1 gene mutations in Hailey – Hailey disease and possible roles of SPCA1 isoforms in membrane trafficking. *Nature review*7(6), e2259-16.
- Middelbeek, J., Kuipers, A. J., Henneman, L., Visser, D., Eidhof, I., Horssen, R. Van, *et al.* (2012). TRPM7 Is Required for Breast Tumor Cell Metastasis. *Cancer Cell International*, 7(16), 4250–4262.
- Mintz, I. M., Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Bean, B. P., & M E Adams. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin w-AgaIVA. *Nature letter*, volume 355 (27 February).
- Mlinar, B. B., & Enyeart, J. J. (1993). The Ohio State University College of Medicine , Columbus , OH 43210-1239 , USA. *Journal of Physiology*, 639–652.
- Monaghan, A. S., Benton, D. C. H., Bahia, P. K., Hosseini, R., Shah, Y. A., Haylett, D. G., &

- Moss, G. (2004). The SK3 Subunit of Small Conductance Ca²⁺-activated K⁺Channels Interacts with Both SK1 and SK2 Subunits in a Heterologous Expression System. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1003–1009.
- Monteith, G. R., Prevarskaya, N., & Roberts-thomson, S. J. (2017). The calcium – cancer signalling nexus. *Nature Publishing Group*, 17(6), 367–380.
- Moreno, C. M., Dixon, R. E., Tajada, S., Yuan, C., Opitz-araya, X., Binder, M. D., & Santana, L. F. (2016). Ca²⁺ entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered CaV1.3 channels. *eLife*, 1–26.
- Mottola, G., Chatterjee, A., Wu, B., Chen, M., & Conte, M. S. (2017). Aspirin-triggered resolvin D1 attenuates PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration via the cyclic adenosine monophosphate / protein kinase A (cAMP / PKA) pathway. *Plos One*, 1–20.
- Müller, C., Más, N., Ruth, P., & Strauß, O. (2014). Ca V 1.3 L-type channels , maxiK Ca²⁺-dependent K⁺ channels and bestrophin-1 regulate rhythmic photoreceptor outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cellular Signalling*, 26(5), 968–978.

N

- Nashida, T., Takuma, K., Fukuda, S., Kawasaki, T., Takahashi, T., Baba, A., *et al.* (2011). Neurochemistry International The specific Na⁺/ Ca²⁺ exchange inhibitor SEA0400 prevents nitric oxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, 59(1), 51–58.
- Naviglio, S., Gesto, D. D., Illiano, F., Chiosi, E., Giordano, A., Illiano, G., & Spina, A. (2010). Leptin Potentiates Antiproliferative Action of cAMP Elevation via Protein Kinase A Down-Regulation in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology*, (June), 801–809.
- Neary, C. L., Nesterova, M., Cho, Y. S., Cheadle, C., Becker, K. G., & Cho-chung, Y. S. (2004). Protein kinase A isozyme switching : eliciting differential cAMP signaling and tumor reversion. *Oncogene*, 8847–8856.
- Neelands, T. R., King, A. P., Macdonald, R. L., Torben, R., & Mac, R. L. (2000). Functional Expression of L- , N- , P / Q- , and R-Type Calcium Channels in the Human NT2-N Cell Line. *The American Physiological Review*, 2933–2944.
- Neely, A., & Hidalgo, P. (2014). Structure-function of proteins interacting with the α 1 pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels. *Frontiers in Physiology*, 5(June), 1–19.
- Negro, A., Dodge-Kafka, K., & Kapiloff, M. (2008). Signalosomes as Therapeutic Targets. *Progress Pediatr Cardiol*, 25(1), 51–56.
- Ngo-anh, T. J., Bloodgood, B. L., Lin, M., Sabatini, B. L., Maylie, J., & Adelman, J. P.

(2005). SK channels and NMDA receptors form a Ca^{2+} -mediated feedback loop in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, 8(5).

Nguidjoe E, & Herchuelz, A. (2007). Overexpression of Na^{+} / Ca^{2+} Exchanger Reduces Viability and Proliferation of Gliosarcoma Cells. *New York Academy of Sciences*, 468, 2007.

Nicoll, D. A., Sawaya, M. R., Kwon, S., Cascio, D., Philipson, K. D., & Abramson, J. (2006). The Crystal Structure of the Primary Ca^{2+} Sensor of the Na^{+} / Ca^{2+} Exchanger Reveals a Novel, 281(31), 21577–21581.

O

Ottolia, M., Philipson, K. D., & John, S. (2004). Conformational Changes of the Ca^{2+} Regulatory Site of the Na^{+} / Ca^{2+} Exchanger Detected by FRET. *Biophysical Journal*, 87(August), 899–906.

P

Palty, R., Silverman, W. F., Hersh, M., Caporale, T., Sensi, S. L., & Parnis, J. (2009). NCLX is an essential component of mitochondrial. *PNAS*.

Pandya, P., Orgaz, J. L., & Sanz-moreno, V. (2017). Modes of invasion during tumour dissemination. *Molecular Oncology*, 11, 5–27.

Pankova, K. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Science*, 63–71.

Papa, M., Canitano, A., Boscia, F., Castaldo, P., Sellitti, S., Porzig, H., *et al.* (2003). Differential Expression of the Na^{+} / Ca^{2+} Exchanger Transcripts and Proteins in Rat Brain Regions. *The Journal of Comparative Neurology*, 48(December 2002), 31–48.

Park, E., Campbell, E. B., & Mackinnon, R. (2017). Article Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature Publishing Group*, 541(7638), 500–505.

Paul, K., Keith, D. J., & Johnson, S. W. (2003). Modulation of calcium-activated potassium small conductance (SK) current in rat dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience Letters*, 348, 180–184.

Paulucci-holthauzen, A. A., Vergara, L. A., Bellot, L. J., Canton, D., Scott, J. D., & Connor, K. L. (2009). Spatial Distribution of Protein Kinase A Activity during Cell Migration Is Mediated by A-kinase Anchoring Protein AKAP Lbc. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5956–5967.

Pelzl, L., Hosseinzadeh, Z., Al-Maghout, T., Singh, Y., Sahu, I., Bissinger, R., *et al.* (2017). Role of Na^{+} / Ca^{2+} Exchangers in Therapy Resistance of Medulloblastoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1240–1251.

- Pelzl, L., Hosseinzadeh, Z., Alzoubi, K., Al-Maghout, T., Schmidt, S., Stournaras, C., & Langa, F. (2015). Impact of Na⁺ / Ca²⁺ Exchangers on Therapy Resistance of Ovary Carcinoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1857–1868.
- Pierce, S. L., & England, S. K. (2010). SK3 channel expression during pregnancy is regulated through estrogen and Sp factor-mediated transcriptional control of the KCNN3 gene. *J. Physiol.*, 640–646.
- Potier, M., An, T., Chantome, A., Girault, A., Joulin, V., Bougnoux, P., *et al.* (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications Altered SK3 / KCa2 . 3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(1), 42–47.
- Potier, M., Joulin, V., Besson, P., Jourdan, M., Leguennec, J., Bougnoux, P., & Vandier, C. (2006). Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2946–2954.
- Pragnel, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., & Campbell, K. P. (1994). Calcium channel B-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α 1-subunit. *Nature letter*, volume 368 (3 March).
- Pribnow, D., Johnson-Pais, T., Bond, C., & Keen, J. (1999). Skeletal muscle and small-conductance calcium activated potassium channels. *Muscle Nerve*, (June), 742–750.
- Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Deygas, M., & Rimokh, R. (2016). Mitochondrial Ca²⁺ uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. *Nature Publishing Group*, (October), 1–13.

Q

- Quang, C. T., Leboucher, S., Passaro, D., Fuhrmann, L., Nourieh, M., & Ghysdael, J. (2015). The calcineurin / NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. *Cell Death & Disease*, 6(2), e1658-10.
- Quednau, B. D., Nicoll, D. A., & Philipson, K. D. (2004). The sodium / calcium exchanger family — SLC8. *Pflugers Arch*, 7943, 543–548.

R

- Radhakrishnan, V. M., Gilpatrick, M. M., Parsa, N. A., Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2017). Expression of Ca v 1 . 3 calcium channel in the human and mouse colon : posttranscriptional inhibition by IFN γ . *American Journal of Physiology Gastrointest Liver Physiol*, 77–84.
- Ramadan, O., Qu, Y., Wadgaonkar, R., Baroudi, G., Karnabi, E., & Chabine, M. (2009). Phosphorylation of the Consensus Sites of Protein Kinase A on aD L-type Calcium

Channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5042–5049.

- Remillard, C. V., & Leblanc, N. (1996). Mechanism of inhibition of delayed rectifier K⁺ current by 4-aminopyridine in rabbit coronary myocytes. *Journal of Physiology*, 383–400.
- Ren, Y., Barnwell, L. F., Alexander, J. C., Lubin, F. D., Adelman, J. P., Pfaffinger, P. J., *et al.* (2006). Regulation of surface localization of the small conductance Ca²⁺-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11769–11779.
- Reuter, H., Henderson, S. A., Han, T., Matsuda, T., Baba, A., Ross, R. S., *et al.* (2002). Knockout Mice for Pharmacological Screening. *Circulation Research*, (90), 90–93.
- Robert, V., Triffaux, E., Paulet, P., Pelletier, L., & Savignac, M. (2014). Protein kinase C – dependent activation of CaV1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *J Allergy Clin Immunol.*
- Rochais, F., Lefebvre, F., Lugnier, C., Lum, H., Mazet, J., Cooper, D. M. F., & Fischmeister, R. (2004). Negative Feedback Exerted by cAMP-dependent Protein Kinase and cAMP Phosphodiesterase on Subsarcolemmal cAMP Signals in Intact Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52095–52105.

S

- Sandoval, A., Oviedo, N., Andrade, A., & Felix, R. (2004). Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the $\alpha 2d$ subunit-mediated regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *The FEBS Journal*, 576, 21–26.
- Schnetkamp, P. P., Jalloul, A. H., Liu, G., & Szerencsei, R. T. (2014). The SLC24 Family of K⁺ Dependent Na⁺/ Ca²⁺ Exchangers: Structure – Function Relationships. Exchangers. *Elsevier Inc*, volume 73, 1063-5823.
- Selitrennik, M., & Lev, S. (2015). PYK2 integrates growth factor and cytokine receptors signaling and potentiates breast cancer invasion via a positive feedback loop. *Oncotarget*, 6(26).
- Shah, M. M., & Haylett, D. G. (2002). K⁺ Currents Generated by NMDA Receptor Activation in Rat Hippocampal Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 2983–2989.
- Shao, Y., Alicknavitch, M., & Farach-carson, M. C. (2005). Expression of Voltage Sensitive Calcium Channel (VSCC) L-type Ca v 1.2 ($\alpha 1C$) and T-type Ca v 3.2 ($\alpha 1H$) Subunits During Mouse Bone Development. *Developmental Dynamics*, 2(July), 54–62.
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels : Structure , Function , and Dysfunction. *NEURON*, 82(1), 24–45.

- Singh, A., Gebhart, M., Fritsch, R., Sinnegger-brauns, M. J., Poggiani, C., Hoda, J., *et al.* (2008). Modulation of Voltage- and Ca²⁺-dependent Gating of CaV1.3 L-type Calcium Channels by Alternative Splicing of a C-terminal Regulatory Domain. *J Biol Chem*, 283(30), 20733–20744.
- Skibsbye, L., Poulet, C., Diness, J. G., Bentzen, B. H., Yuan, L., Kappert, U., *et al.* (2014). Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovascular Research*, 156–167.
- Smaardijk, S., Chen, J., Wuytack, F., & Vangheluwe, P. (2017). Tissue and Cell SPCA2 couples Ca²⁺ influx via Orai1 to Ca²⁺ uptake into the Golgi / secretory pathway. *Tissue and Cell*, 49, 141–149.
- Soh, H., & Park, C. (2001). Inwardly Rectifying Current-Voltage Relationship of Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Rendered by Intracellular Divalent Cation Blockade. *Biophysical Journal*, 80(5), 2207–2215.
- Song, K., Zhong, X., Xia, X., Huang, J., Fan, Y., Yuan, R., *et al.* (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications Orai1 forms a signal complex with SK3 channel in gallbladder smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(3), 456–462.
- Song, M., Chen, D., & Yu, S. P. (2014). The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na⁺ / Ca²⁺ exchanger and increasing intracellular Ca²⁺. *British Journal of Pharmacology*. 171 3432–3447.
- Sousa, S. R., Vetter, I., Ragnarsson, L., & Lewis, R. J. (2013). Expression and Pharmacology of Endogenous Ca^v Channels in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Plos One*, 8(3).
- Squecco, R., Tani, A., Zecchi-orlandini, S., Formigli, L., & Francini, F. (2015). Melatonin affects voltage-dependent calcium and potassium currents in MCF-7 cell line cultured either in growth or differentiation medium. *European Journal of Pharmacology*, 758, 40–52.
- Srivastava, U., Aromolaran, A. S., Fabris, F., Lazaro, D., Kassotis, J., Qu, Y., & Boutjdir, M. (2016). Biochemical and Biophysical Research Communications Novel function of a 1D L-type calcium channel in the atria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–6.
- Steinestel, K., Eder, S., Ehinger, K., Schneider, J., Genze, F., Winkler, E., *et al.* (2016). The small conductance calcium-activated potassium channel 3 (SK3) is a molecular target for Edelfosine to reduce the invasive potential of urothelial carcinoma cells. *Tumor Biology*, 3, 6275–6283.
- Stocker, M. (2004). Ca²⁺-activated K⁺ channels : molecular determinants and function of the

SK family. *Nature*, 5(October),57:463–472.

Stocker, M., & Pedarzani, P. (2000). Differential Distribution of Three Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Subunits, SK1, SK2, and SK3, in the Adult Rat Central Nervous System, 493, 476–493.

Stowe D.F., Zhou, Y., Aldakkak, M., Cheng, Q., Kwok, W.M., *et al.* (2013). Protection against cardiac injury by small Ca²⁺-sensitive K⁺channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1828(2), 427–442.

Sun, Y., Gao, X. U., Tang, Y., Xu, C., & Wang, L. (2006). Androgens Induce Increases in Intracellular Calcium Via a G Protein – Coupled Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Journal of Andrology*, 27(5), 671–678.

Sunahara, R. K., & Taussig, R. (2002). Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase : *Molecular Interventions*, 168–184.

T

Tajima, N., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., & Heinemann, S. H. (2006). Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1 α and the von Hippel-Lindau protein. *J. Physiol.*, 2, 349–359.

Tandan, S., Wang, Y., Wang, T. T., Jiang, N., Hall, D. D., Johannes, W., *et al.* (2011). Physical and Functional Interaction Between Calcineurin and the Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel. *Circ Res AHA*, 105(1), 51–60.

Torrente, A. G., Mesirca, P., Neco, P., Rizzetto, R., Dubel, S., Barrere, C., *et al.* (2016). L-type CaV1.3 channels regulate ryanodine receptor- dependent Ca²⁺ release during sino-atrial node pacemaker activity. *Cardiovascular Research*, 451–461.

Toyoshima, C. (2008). Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 3–11.

Tsai, F., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjö, S., & Meyer, T. (2014). A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nature Cell Biology*, 16(2).

Tseng, P., Henderson, P., Hergarden, A. C., Patriarchi, T., Coleman, A. M., Lillya, M. W., *et al.* (2017). α -Actinin Promotes Surface Localization and Current Density of the Ca²⁺ Channel CaV1.2 by Binding to the IQ Region of the $\alpha 1$ Subunit. *Biochemistry*.

Tuteja, D., Rafizadeh, S., Timofeyev, V., Wang, S., & Zhang, Z. (2010). Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK) channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C-termini of the channels. *Circ Res*, 107(7), 851–859.

U-V

- Valerie, N. C. K., Dziegielewska, B., Hosing, A. S., Augustin, E., Gray, L. S., Brautigan, D. L., *et al.* (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, *85*(7), 888–897.
- Vandael, D. H. F., Mahapatra, S., Calorio, C., Marcantoni, A., & Carbone, E. (2013). CaV1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: Emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1828*(7), 1608–1618.
- Vanhouten, J., Sullivan, C., Bazinet, C., Ryoo, T., Camp, R., Rimm, D. L., & Chung, G. (2010). PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer. *PNAS*, *107*(25), 1–6.
- Vanoevelen, J., Dode, L., Baelen, K. Van, Fairclough, R. J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., & Wuytack, F. (2005). The Secretory Pathway Ca²⁺ / Mn²⁺ -ATPase 2 is a Golgi-localized Pump with High Affinity for Ca²⁺ Ions. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 22800–22808.
- Vig, M., & Kinet, J. (2009). Calcium signaling in immune cells. *Nature Immunology*, *10*(1), 21–28.
- Vincent, P. F., Bouleau, Y., Petit, C., & Dulon, D. (2015). A synaptic F-actin network controls otoferlin-dependent exocytosis in auditory inner hair cells. *eLife*, 1–13.

W

- Wang, C., Lai, M., Phan, N. N., Sun, Z., & Lin, Y. (2015). Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *Plos One*, 1–21.
- Wang, X., Nagaba, Y., Cross, H. S., Wrba, F., Zhang, L., & Guggino, S. E. (2000). The mRNA of L-Type Calcium Channel Elevated in Colon Cancer Protein Distribution in Normal and Cancerous Colon. *American Journal of Pathology*, *157*(5), 1549–1562.
- Weatherall, K. L., Goodchild, S. J., Jane, D. E., & Marrion, N. V. (2010). Progress in Neurobiology Small conductance calcium-activated potassium channels : From structure to function. *Progress in Neurobiology*, *91*(3), 242–255.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., & Wulff, H. (2005). Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Physiological Reviews*, *57*(4), 463–472.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L., & Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, *457*(7231), 901–905.
- Wei, C., Wang, X., Zheng, M., & Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, *24*(2), 254–261.
- Willoughby, D., & Cooper, D. M. F. (2007). Organization and Ca²⁺ Regulation of Adenylyl

Cyclases in cAMP Microdomains. *Physiological Reviews*, 965–1010.

Wolfart, J., & Roeper, J. (2002). Selective Coupling of T-Type Calcium Channels to SK Potassium Channels Prevents Intrinsic Bursting in Dopaminergic Midbrain Neurons. *The Journal of General Physiology*, 22(9), 3404–3413.

Wulff, H., & Ralf Köhler. (2013). Endothelial Small- and intermediate-Conductance KCa Channels: An Update on Their Pharmacology and Usefulness as Cardiovascular Targets. *J Cardiovasc Pharmacol*, 61(2), 102–112.

X

Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Keen, J. E., Ishii, T., *et al.* (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 438(1995), 167–170.

Xie, X., Wu, G., Lu, Z., & Ledeen, R. W. (2002). Potentiation of a sodium – calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *Journal of Neurochemistry*, 1185–1195.

Y

Yang, G., Shi, Y., Yu, J., Li, Y., Yu, L., Welling, A., *et al.* (2015). CaV1.2 and CaV1.3 channel hyperactivation in mouse islet b cells exposed to type 1 diabetic serum. *Cell Mol Life Sci*, 72(6), 1197–1207.

Yang, L., Katchman, A., Morrow, J. P., Doshi, D., & Marx, S. O. (2011). Cardiac L-type calcium channel (CaV1.2) associates with γ subunits. *The FASEB Journal*, 25(3), 928–936.

Yang, S., & Huang, X. (2005). Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 12–14.

Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J., & Inesi, G. (1993). H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophysical Journal*, 64(4), 1232–1242.

Z

Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Physiological Reviews*, 901758(October), 821–870.

Zhang, H., Fu, Y., Altier, C., Platzer, J., Surmeier D. James, & Bezprozvanny, I. (2006). CaV 1.2 and CaV 1.3 neuronal L-type calcium channels: differential targeting and signaling to pCREB. *European Journal of Neuroscience*, 23(9), 2297–2310.

Zhang, X.-D., Lieu, D. K., & Chiamvimonvat, N. (2015). HHS Public Access. *Heart Rhythm*, 12(8), 1845–1851.

Zhang, Y., Mori, M., Burgess, D. L., & Noebels, J. L. (2002). Mutations in High-Voltage-Activated Calcium Channel Genes Stimulate Low-Voltage-Activated Currents in Mouse Thalamic Relay Neurons.

Zhu, G., Liu, Z., Epstein, J. I., Davis, C., Christudass, C. S., Carter, H. B., *et al.* (2015). A Novel Quantitative Multiplex Tissue Immunoblotting for Biomarkers Predicts a Prostate Cancer Aggressive Phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (24 December) 1864–1873.

Ouvrage imprimé consulté

MOLNAR P., HICKMAN J.J. (2007). Patch-clamp methods & protocols (Methods in molecular biology, Vol. 403).

Sites web consultés

Site ATCC lignées cellulaires [Référence du 17 Juin 2017].

<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/>

The Human Protein Atlas. [Référence du 10 Juin 2017]

<http://www.proteinatlas.org/>

HUGO Gene Nomenclature Committee. [Référence du 22 février 2017].

<http://www.genenames.org/>

The International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [Référence du 09 février 2016].

<http://www.iuphar.org/>

Uniprot. [Référence du 22 Janvier 2017].

<http://www.uniprot.org/>

Servier Médical Art. [Référence du 03 Mars 2017], banque d'images power-point

<http://www.servier.fr/servier-medicalart/>

**Régulation de la migration des cellules
cancéreuses coliques HCT-116 par la sous-
unité $\alpha 1D$ et du canal SK3 par la voie
AMPC-PKA**

Résumé

De plus en plus d'études désignent les canaux K^+ et Ca^{2+} comme de nouvelles cibles très prometteuses pour des thérapies anticancéreuses. Parmi ces canaux, les canaux SK3 et CaV1.3 ont été identifiés comme des régulateurs de la migration des cellules cancéreuses. Lors de mes travaux de thèse, nous avons découvert une nouvelle voie de signalisation montrant que la protéine $\alpha 1D$ du canal CaV1.3 est impliquée dans la régulation de l'homéostasie Ca^{2+} ainsi que dans la migration cellulaire, par un mécanisme indépendant de sa fonction canonique. En parallèle nous avons identifié des résidus sérines du canal SK3 qui sont importants dans la régulation négative du canal SK3 par l'activation de la voie AMPC-PKA. Ces résultats suggèrent également que l'Ohmlin, un éther-lipide de synthèse, inhibiteur du canal SK3, ne réduit pas l'activité du canal SK3 en favorisant sa phosphorylation suite à l'activation de la voie AMPC-PKA.

Mots-clés : $\alpha 1D$, CaV1.3, SK3, Ca^{2+} , AMPC, PKA, HCT-116, migration.

Abstract

Many studies show that K^+ and Ca^{2+} channels are promising new targets for anticancer therapies. Among these channels, SK3 and CaV1.3 ion channels have been identified as regulators of cancer cell migration. Here, we have discovered a new signalization pathway showing that the $\alpha 1D$ protein of the CaV1.3 channel is involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis and in cell migration by a mechanism independent of its canonical function. In parallel, we have identified serine residues of SK3 channel that are important in the negative regulation of the SK3 channel by activation of the cAMP-PKA pathway. These results also suggest that Ohmlin, a synthetic ether-lipid, and inhibitor of SK3 channel, does not reduce the activity of SK3 channel by promoting its phosphorylation following the activation of the cAMP-PKA pathway.

Keywords: $\alpha 1D$, CaV1.3, SK3, Ca^{2+} , cAMP, PKA, HCT-116, migration.